

# **Untersuchungen zur Hautpermeation von Opiatsalzen organischer Säuren**

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt

von

Bernd Adam

aus Treysa

Marburg / Lahn 1999

Vom Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie  
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 29.9.1999 angenommen

Erstgutachter: Prof. Dr. Matusch

Zweitgutachter: Prof. Dr. Kissel

Tag der mündlichen Prüfung am 3.11.1999

Die vorliegende Arbeit entstand am  
Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie  
der Philipps-Universität Marburg  
auf Anregung und unter Leitung von

**Herrn Prof. Dr. Rudolf Matusch**

Für das interessante Themengebiet sowie seine ideenreiche und engagierte  
Unterstützung bei Problemen aller Art und zu jeder Zeit möchte ich ihm an  
dieser Stelle sehr herzlich danken.

## **Danksagung**

Der Firma Lohmann Therapie Systeme möchte ich für die finanzielle Unterstützung danken.

Meinem Freund und Kollegen Andreas Koch danke ich für seine geduldige und fleißige Mitarbeit.

Meinen Kollegen und den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Fachbereichs 16, ganz besonders Herrn Floris van Elsäcker, Herrn Erwin Schott und Herrn Peter Osswald danke ich für die fachlich kompetente und stets freundliche Hilfe.

Frau Dr. Gabriela Laufenberg und Herrn Dr. Winfried Fiedler danke ich für ihre Unterstützung bei der Entwicklung der massenspektrometrischen Methoden und den Mitarbeitern der NMR-Abteilung für ihre geduldige Hilfe während der NMR-Experimente.

Herrn Dr. Boris Ferger möchte ich für seine kompetente Unterstützung danken.

Meiner Frau Sonia und meinen Eltern danke ich für ihre Geduld und Unterstützung während der Promotionszeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt den Verantwortlichen, Planenden und Ausführenden der inzwischen mehrere Jahre andauernden Bauarbeiten am Gebäude des Institutes für pharmazeutische Chemie. Sie werden mir mit ihren steten, deutlich spürbaren Bemühungen um Veränderung und den dadurch geschaffenen, einzigartigen Bedingungen zur Durchführung analytischer Arbeiten immer in Erinnerung bleiben.

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Theoretischer Teil</b>	<b>Seite</b>
<b>1. Einleitung und Aufgabenstellung</b>	1
<b>2. Der Arzneistoff Morphin</b>	4
2.1 Herkunft des Morphins	4
2.2 Geschichte des Morphins	4
2.3 Charakterisierung des Morphins	5
2.4 Pharmakodynamische Eigenschaften des Morphins	8
2.5 Pharmakokinetische Eigenschaften des Morphins	10
2.6 Schmerztherapie mit Morphin	11
2.7 Eine alternative Applikationsform für Morphin	12
<b>3. Transdermale Applikation von Morphin</b>	14
3.1 Aufbau der Haut	14
3.2 Penetration von Arzneistoffen durch die Haut	15
3.3 Faktoren der perkutanen Absorption	16
3.4 Transdermale Morphinapplikation	21
<b>4. Untersuchung der Hautpermeation unterschiedlicher Morphiniumsalze</b>	24
4.1 Die Diffusionszelle	24
4.2 Untersuchung der Permeationsraten der Morphin-Base und fünf Morphiniumsalzen organischer Carbonsäuren	25
<b>5. Entwicklung eines Dreiphasensystems als Modell für die Permeation von Wirkstoffen durch die Haut</b>	29
5.1 Das U-Rohrmodell	29
5.2 Vergleich der Permeationsresultate an Meerschweinchenhaut mit denen des U-Rohrmodells.	32
5.3 Auswahl weiterer Carbonsäuren zur Herstellung von Morphiniumsalzen und deren Permeationsverhalten im U-Rohrmodell	35
<b>6. Berechnung des Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten der eingesetzten Säuren</b>	43
<b>7. Bestimmung der pKs-Werte der eingesetzten Säuren</b>	45
7.1 Bestimmung der pKs-Werte und der Vergleich mit den Permeationseigenschaften der entsprechenden Morphiniumsalze	45

	<b>Seite</b>
<b>8. Massenspektrometrische Untersuchungen der Morphiniumsalz-Ionenpaare</b>	49
8.1 Das APCI Ionisierungs- und Probenzuführungsverfahren	50
8.2 Nachweis des Morphinium-2-methoxybenzoat-Ionenpaares	53
8.3 Nachweis des Morphiniumtrimethylbenzoat-Ionenpaares	60
8.4 Nachweis des Morphiniumphenoxyacetat-Ionenpaares	63
8.5 Nachweis des Morphiniummonomethylsebacat-Ionenpaares	66
8.6 Nachweis des Morphiniumibuprofenat-Ionenpaares	68
<b>9. Dampfdruckosmotrische Untersuchungen der Morphiniumsalz-Ionenpaare</b>	71
9.1 Dampfdruckosmotrische Untersuchungen von Morphiniumbenzoatlösungen ansteigender Konzentration	71
9.2 Vergleich des osmotischen Druckes verschiedener Morphiniumsalzlösungen gleicher Konzentration	75
<b>10. <sup>1</sup>H NMR-spektroskopische Untersuchungen der Morphiniumsalz-Ionenpaare</b>	81
10.1 Das Spektrum der Morphin-Base	81
10.2 Vergleich der <sup>1</sup> H NMR-Spektren des Morphiniumtrimethylbenzoats mit Morphin-Base und Morphiniumformiat in Deuteriochloroform	84
10.3 Vergleich der <sup>1</sup> H NMR-Spektren des Morphiniumtrimethylbenzoats mit Morphin-Base und Morphiniumformiat in Deuteromethanol	85
<b>11. Entwicklung einer neuen Methode zur Extraktion von Morphin aus Rattenhirn sowie dessen quantitativen Bestimmung</b>	90
<b>12. Untersuchung der Hautpermeation von Hydromorphon und dessen organischen Säureadditionssalz sowie deren Charakterisierung</b>	95
12.1 Chemische und pharmakologische Eigenschaften des Hydromorphons	95
12.2 Untersuchung des Permeationsverhaltens von Hydromorphoniumsalzen im U-Rohrmodell.	96
12.3 Massenspektrometrische Untersuchungen von Hydromorphoniumsalzen	98
12.4 Dampfdruckosmotrische Untersuchungen von Hydromorphoniumsalz-Ionenpaaren	101
12.5 <sup>1</sup> H NMR-Spektroskopische Untersuchungen des Hydromorphoniumphenoxyacetat-Ionenpaares	103

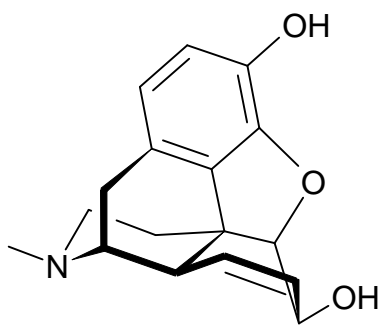
	<u>Seite</u>
<b>13. Untersuchung der Hautpermeabilität von Diamorphin und dessen organischer Säureadditionssalze sowie deren Charakterisierung</b>	107
13.1 Chemische und pharmakologische Eigenschaften des Diamorphins	107
13.2 Therapie der Opiatsucht mit diamorphinhaltigen transdermalen therapeutischen Systemen	108
13.3 Untersuchung der Hautpermeationseigenschaften unterschiedlicher Diamorphiniumsalze	110
13.4 Massenspektrometrische Untersuchungen der Diamorphiniumsalz-Ionenpaare	112
<b>14. Zusammenfassung und Ausblick</b>	114
 <b><u>Experimenteller Teil</u></b>	 <b><u>Seite</u></b>
<b>15. Hautpermeationsuntersuchungen der Morphiniumsalze aus Tylose/ Wasser-Vehikel durch Meerschweinchenhaut</b>	116
15.1 Allgemeine Vorschrift zur Herstellung der Zubereitung zum Auftrag auf die Applikationshilfe	116
15.2 Vorbereitung der Diffusionszelle und Einspannen des Applikationshilfe-Haut-Stückes	116
15.3 Probenentnahme und quantitative Auswertung	117
15.4 Liste der eingesetzten Materialien und Geräte	117
15.5 Gemessene Einzelwerte: Permeierte Morphinmenge $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Haut	118
<b>16. U-Rohr Permeationsversuche mit Morphinium- und Hydromorphoniumsalzen</b>	122
16.1 Allgemeine Vorschrift	122
16.2 Tabellierte Morphin- und Hydromorphonkonzentrationen im Akzeptormedium	123
<b>17. Durchführung der pKs-Bestimmungen</b>	127
<b>18. Berechnung des Verteilungskoeffizienten logP</b>	127
<b>19. Durchführung der massenspektrometrischen Bestimmungen</b>	127
19.1 Allgemeine Vorschrift	127
19.2 Eingesetzte Geräte und Chemikalien	128
19.3 Massenspektrometrische Daten	129

	<b>Seite</b>
<b>20. Dampfdruckosmotrische Messungen von Morphinium- und Hydromorphoniumsalzen</b>	133
20.1 Morphiniumsalze	133
20.1.1 Standardvorschrift zur Herstellung von Lösungen genauer Molalität zur Dampfdruckosmolalitätsbestimmung	134
20.1.2 Bestimmung der Dampfdruckosmolalitätserniedrigung von Morphiniumbenzoatlösungen in Abhängigkeit von der Konzentration	135
20.1.3 Bestimmung der Dampfdruckosmolalitätserniedrigung unterschiedlicher Morphiniumsalze in Chloroform	135
20.1.4 Bestimmung der Dampfdruckosmolalitätserniedrigung unterschiedlicher Morphiniumsalze in Isopropanol	139
20.2 Hydromorphoniumsalze	143
20.2.1 Bestimmung der Dampfdruckosmolalitätserniedrigung unterschiedlicher Hydromorphoniumsalze in Isopropanol	143
20.2.2 Bestimmung der Dampfdruckosmolalitätserniedrigung unterschiedlicher Hydromorphoniumsalze in Chloroform	145
<b>21. Verwendete Substanzen</b>	147
21.1 Freisetzung der Morphin-Base und Hydromorphon-Base aus ihren Hydrochloriden	146
21.2 Synthese der Heroin-Base aus Morphin-Base	146
21.3 Standardvorschrift zur Herstellung von Morphinium- und Hydromorphoniumsalzen	147
21.4 Verwendete Säuren (Lieferant)	147
<b>22. Durchführung der <sup>1</sup>H NMR-Spektroskopischen Bestimmungen</b>	148
<b>23. Durchführung der In-Vivo Untersuchungen zur transdermalen Applikation von Morphin</b>	149
23.1 Vorschrift zur Applikation eines TTS auf einer Wistar-Ratte und Präparation des Gehirns	149
23.2 Probenaufarbeitung	149
23.3 HPLC-Methode	149
23.4 Materialien und Geräte	150
<b>24. Schmelzpunkte der Morphiniumsalze</b>	152
<b>Literatur</b>	153

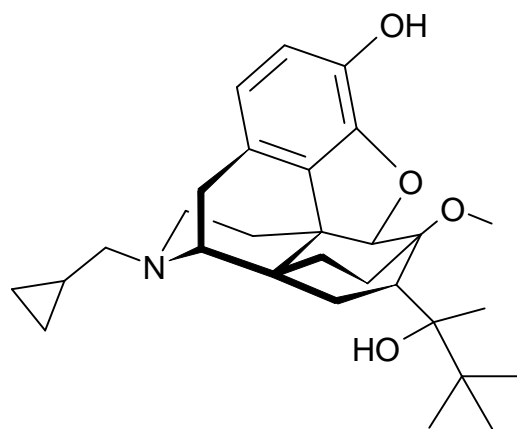


## 1. Einleitung und Aufgabenstellung

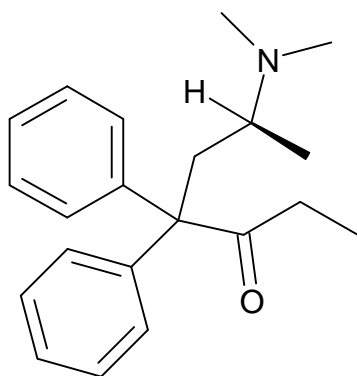
Weltweit leiden etwa neun Millionen Menschen unter Tumorschmerzen. Dabei überwiegen neben den therapiebezogenen die chronischen, tumorbedingten Schmerzen<sup>1)</sup>. Die Therapie dieser Schmerzen findet meist nach dem dreistufigen Therapieschema der WHO statt. Danach werden Schmerzpatienten der Stufe 3 (starke und stärkste Schmerzen) mit Morphin (1), Buprenorphin (2), Levomethadon (3) und Fentanyl (4) behandelt.



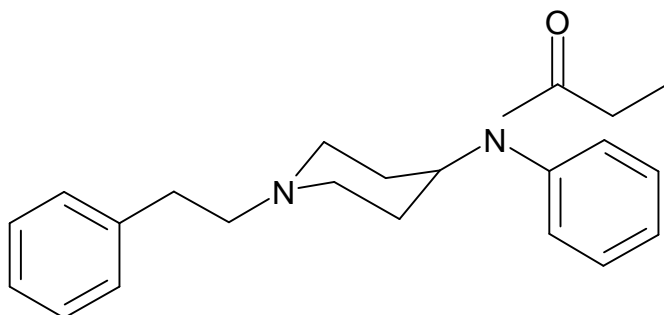
**Morphin (1)**



**Buprenorphin (2)**



**Levomethadon (3)**



**Fentanyl (4)**

Den Hauptanteil der ärztlichen Verordnungen stellt das Morphin. Die Verordnungshäufigkeit von Morphin liegt jedoch unter dem zur optimalen

Schmerztherapie benötigten Maß. Dies liegt zum einen an der Betäubungsmittelverschreibungsverordnung, zum anderen jedoch auch an -bei sachgemäßer Anwendung unbegründeten- Ängsten vor Abhängigkeit, Toleranzentwicklung und Atemdepression<sup>2)</sup>. Die Nachteile der anderen Therapeutika dieser Gruppe gegenüber dem Morphin, wie die fehlende Antagonisierbarkeit bei Buprenorphin, hohe Kumulationsgefahr bei Levomethadon und die geringe therapeutische Breite des Fentanyls sind hinlänglich bekannt<sup>1)</sup>. Von hohem Interesse für den Erhalt der Lebensqualität bei der Schmerztherapie ist die Möglichkeit, Tumorkranken im Finalstadium zu Hause in ihrer gewohnten Umgebung zu therapieren. Zur dauerhaften Analgesie bei vollem Bewußtsein ist jedoch eine kontinuierliche Morphingabe, wie sie bisher nur mit apparativem Aufwand (z.B. Infusionspumpen) möglich ist, unerlässlich. Ein Vorteil dieser Option ist die Einsparung von Krankenhauskosten. Dies ist besonders für Betroffene ohne ausreichenden Versicherungsschutz von Bedeutung<sup>3)</sup>. Zu den Kosten für Infusionsautomaten kommen jedoch noch Ausgaben für fachkundiges Pflegepersonal und medizinisches Verbrauchsmaterial wie Spritzen, Kanülen und Infusionsbestecke hinzu.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Methode zur transdermalen Applikation des Arzneistoffes Morphin. Eine derartige Applikationsform ist bisher nicht erhältlich und würde eine weitere Vereinfachung der Schmerztherapie zu Hause, sowie im stationären Bereich darstellen. Um die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften des Morphins nicht zu beeinflussen, wurde die Möglichkeit der Wirkstoffderivatisierung ausgeschlossen. Ein auf diesem Weg gewonnener, neuer Wirkstoff hätte zudem einer neuen Zulassung bedurft, deren Erteilung mit erheblichem Forschungs- und Kostenaufwand verbunden wäre. Auch sollte auf die Verwendung von allgemein hautpermeationsbeschleunigenden Rezepturbestandteilen aufgrund ihres Irritationspotentials verzichtet werden.

Mit der Bildung von Morphiniumsalzen organischer Carbonsäuren, die als Ionenpaare lipophile Membranen passieren können, sollte eine neue Möglichkeit zur transdermalen Verabreichung von Morphin bereitgestellt werden.

Dazu sollte ein Dreiphasenflüssigmembranmodell entwickelt werden, das der Vorauswahl von Substanzen, die für eine transdermale Applikation in Frage kommen, dienen sollte. Damit können im Vergleich zu bisherigen, mit Haut durchgeführten Untersuchungsmethoden, Kosten eingespart werden und Meßungenauigkeiten, die aus Qualitätsschwankungen der natürlichen Haut resultieren, eliminiert werden.

Die Ionenpaarbildung sollte anhand verschiedener analytischer Verfahren wie Massenspektrometrie, Dampfdruckosmometrie und der  $^1\text{H}$  NMR-Spektroskopie gezeigt und charakterisiert werden.

Zum Abschluß sollte die Übertragbarkeit der entwickelten Methoden auf andere pharmazeutisch relevante Opiatbasen und deren Salze gezeigt werden.

## **2. Der Arzneistoff Morphin**

### *2.1 Herkunft des Morphins*

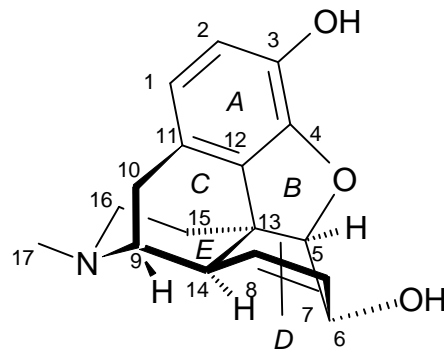
Morphin ist eines der Hauptalkaloide des Opiums, dem getrockneten Milchsafte von *Papaver somniferum*, einer etwa 1,5m hohen, einjährigen, krautigen Kulturpflanze, deren Blätter und Stengel blaugrün bereift sind. Die Biosynthese, Speicherung und Metabolisierung der Opiumalkaloide findet in Alkaloidvesikeln, die im Latex der gegliederten Milchröhren enthalten sind, statt.

Opium enthält etwa 40 Alkaloide, die sich biogenetisch vom Tyrosin bzw. Phenylalanin ableiten. Die Alkaloide, die den Hauptanteil am Gesamtalkaloidgehalt von 20-25% ausmachen, sind die Alkaloide vom Morphinan-Typ und vom Benzylochinolin-Typ. Zu den Alkaloiden der Morphinangruppe zählen Morphin (7-23 %), Codein (0,3-3%) und Thebain(0,3-1%). Papaverin (0,8-1,5%), Noscapin (2-12%) und Narcein (0,1-0,2%) gehören den Benzylochinolinalkaloiden an. Etwa 4% der Alkaloide liegen als Meconat, Fumarat, Lactat und Sulfat vor<sup>4)</sup>.

### *2.2 Geschichte des Morphins*

Morphin ist 4,5a-Epoxy-17-methyl-7-morphinen-3,6a-diol. Der Name Morphin stammt aus dem Altgriechischen. „Morpheus“ ist abgeleitet von der dortigen Bezeichnung für Gestalt. So wurde in hellenistischer Zeit der Sohn des Gottes „Hypnos“ (Schlaf) genannt, der als Dämon dem Schlafenden verschiedene Traumgestalten erscheinen ließ.

1803/1804 wurde von F.W.Sertürner das „schlafmachende Prinzip“ aus Opium isoliert und Morphin genannt. Er begründete die Alkaloidchemie durch seine Entdeckung des „alkaliähnlichen“ Verhaltens von Morphin<sup>5) 6)</sup>. Erstmals verwendet wurde der Begriff „Alkaloide“ von W.Meissner 1819<sup>7)</sup>.

Morphin (**1**)

1925 gelang es R. Robinson, die bis dahin unbekannte Konstitutionsformel des Morphins (**1**) aufzuklären<sup>8</sup>). 1952 gelang erstmals die Totalsynthese des Morphins durch Gates und Tschudi<sup>9</sup>).

Aufgrund des komplizierten Syntheseweges wird Morphin jedoch auch heute noch hauptsächlich aus Opium gewonnen.

### 2.3 Charakterisierung des Morphins

Morphin besitzt fünf chirale Kohlenstoffatome, die direkt miteinander verbunden sind. Nach Cahn-Ingold-Prelog sind diese Kohlenstoffe 5R, 6S, 9R, 13S und 14R konfiguriert.

Die stereochemisch entsprechende Darstellung des Morphinmoleküls in Abbildung 1 zeigt in einem Stereobild zwei planare Molekülteile, die fast senkrecht aufeinanderstehen.

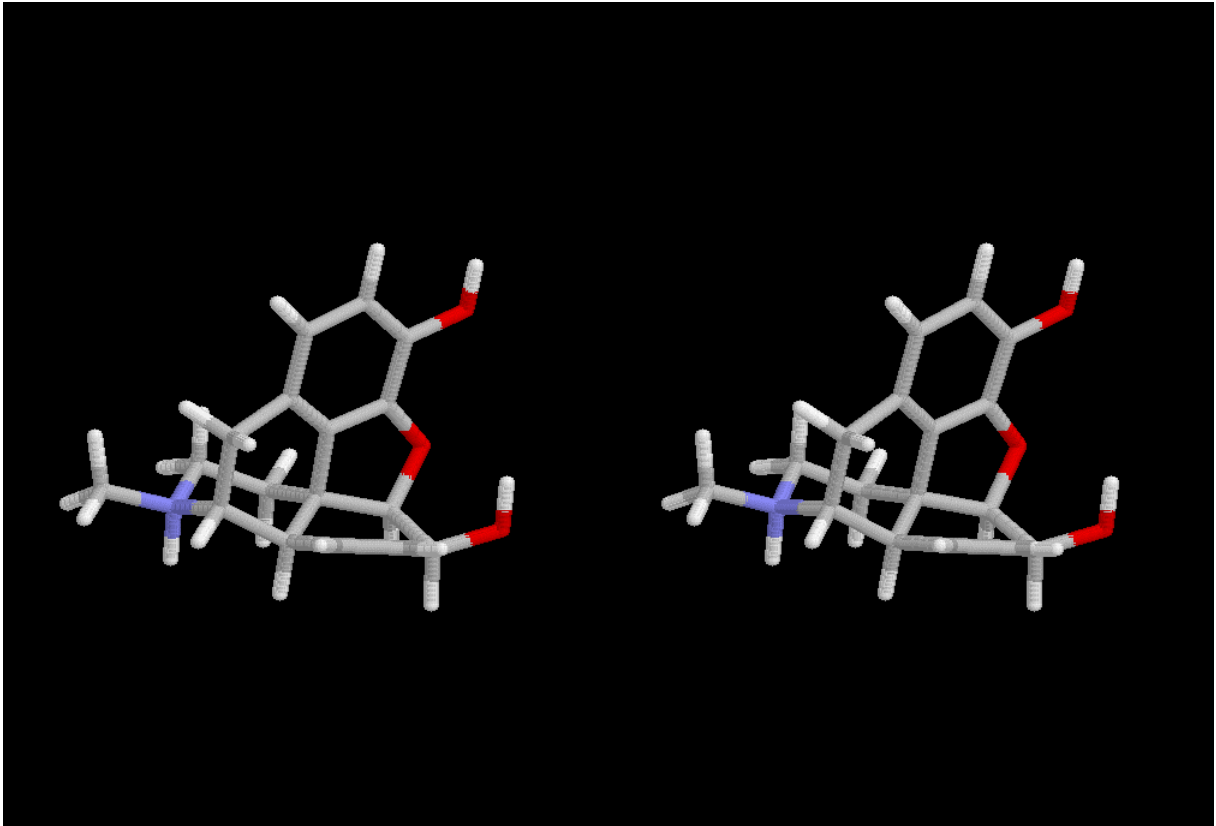


Abb.1: Räumliche Struktur des Morphins

Die Ringe A und B bilden gemeinsam eine Ebene. Diese steht im Winkel von  $90,9^\circ$  auf dem Zweiringsystem D-E<sup>10)</sup>. Daraus resultiert die insgesamt T-förmige Gestalt des Morphinmoleküls<sup>11)</sup>. Die sechs Kohlenstoffatome des aromatischen Ringes A sind nahezu coplanar angeordnet, während der nichtaromatische Ring C eine Halbsesselkonformation aufweist. Der sesselförmige Ethenaminring E ist mit dem durch die Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen 7 und 8 in Wannenkonformation gezwungenen Cyclohexenring D transverknüpft<sup>12)</sup>. Der Sauerstoff an C-3 und die Hydroxylgruppe am C-6 sind zueinander cis-ständig. Morphin hat die Summenformel  $C_{17}H_{19}NO_3$ . Daraus resultiert ein

Molekulargewicht von 285,33. Die Elementarzusammensetzung beträgt: C: 71,56%; H: 6,71%; N: 4,91%; O: 16,82%. Aus Methanol kristallisiert Morphin in kurzen, orthorhombischen, farblosen Prismen, oder feinen, farblosen Nadeln aus<sup>13)</sup>. Im Bereich zwischen 254°C und 256,4°C schmilzt die Substanz unter Zersetzung. Von Bedeutung für die pharmazeutische Anwendung des Morphins sind seine Löslichkeitseigenschaften: 1g Morphin-Base löst sich in ca. 5000 ml Wasser bei Raumtemperatur und in 1100 ml siedendem Wasser. 1g Morphin-Base löst sich in 210 ml Ethanol und in 98 ml siedendem Ethanol; in 1220 ml Chloroform; 6250 ml Ether; 114 ml Amylalkohol; 10 ml siedendem Methanol und 525 ml Ethylacetat. Sehr leicht löslich ist Morphin in Lösungen von Erdalkalihydroxiden, sowie in Phenol und Cresolen; bedingt löslich in Ethanol-Chloroformmischungen und wenig löslich in Benzol und Ammoniak<sup>14)</sup>. Eine gesättigte, wässrige Morphinlösung hat einen pH-Wert von 8,5. Morphin kristallisiert unter Wassereinbindung zum Morphinhydrat, bei dem ein Wassermolekül über Wasserstoffbrückenbindungen von der phenolischen und der alkoholischen Hydroxylgruppe eines Morphinmoleküls, sowie der alkoholischen Hydroxylgruppe eines weiteren Morphinmoleküls fixiert werden. Die phenolische Hydroxylgruppe bildet weiterhin eine Wasserstoffbrückenbindung zum Stickstoff des nächsten Moleküls, so daß eine supramolekulare Struktur resultiert, die einem „nichtkovalenten Polymer“ gleichkommt<sup>12)</sup>. Diese starken, nichtkovalenten Molekülverknüpfungen erklären den hohen Schmelzpunkt und sind letztlich für die -für therapeutische Zwecke unzureichende- Hautpermeation verantwortlich.

#### *2.4 Pharmakodynamische Eigenschaften des Morphins*

Morphin zeigt sowohl im zentralen Nervensystem (ZNS) , als auch in peripheren Körperbereichen durch seine hohe Affinität zu den Opiatrezeptoren  $\mu$  (OP1),  $\delta$  (OP2), und  $\kappa$  (OP3) ( in Klammern sind die seit 1996 gebräuchlichen Rezeptorenbezeichnungen angegeben<sup>15)</sup>)eine dämpfende Wirkung. Unter Opiaten versteht man die Alkaloide aus Opium mit morphinartiger Wirkung und deren partialsynthetische Abkömmlinge. Der modernere Begriff Opioide beschreibt Substanzen, die an den Opiatrezeptoren angreifen und deren Wirkung durch Naloxon antagonisiert werden kann. Die zentral erregenden Effekte sind die Konsequenz auf die Dämpfung inhibitorischer Systeme. An erster Stelle steht bei der therapeutischen Anwendung der analgetische Effekt. Die desinhibitorische Wirkung am limbischen System führt bei einem Teil der Patienten bereits in therapeutischer Dosierung zu einer euphorischen Stimmungslage. Meist tritt jedoch neben der analgetischen eine sedativ-hypnotische Wirkung ein. Weiterhin hat Morphin durch Dämpfung der reflektorischen Erregbarkeit des Hustenzentrums einen antitussiven Effekt. Bei höherer Dosierung besteht die Gefahr der Atemlähmung.

Die letale Dosis, bei der Atemstillstand eintritt, beträgt 200-250 mg. Ist Morphin zuvor bereits dauerhaft verabreicht worden, so entsteht eine Toleranz gegenüber den zentral dämpfenden Effekten. Unter diesen Umständen sind erst höhere Dosierungen lebensbedrohlich. Morphin wirkt außerdem antiemetisch und löst eine Miosis aus<sup>16)</sup>. Bei den peripheren Wirkungen steht die spastische Obstipation an erster Stelle. Aufgrund dieser Wirkung wird Opiumtinktur heute noch zur Behandlung der chronischen Diarrhoe eingesetzt.

Die wichtigsten zentralen und peripheren Wirkungen des Morphins zeigt Tabelle 1.



Zentrale Wirkungen	Periphere Wirkungen
<b><i>Dämpfend</i></b>	Obstipation
Analgesie	Pyloruskonstriktion (dadurch verzögerte Magenentleerung)
Sedativ-hypnotischer Effekt	Tonussteigerung der Blasenmuskulatur
Antitussive Wirkung	Tonussenkung der Blutgefäße
Atemdepression	Kontraktion der Gallenblasenmuskulatur und der Sphinkter in diesem Bereich
<b><i>Erregend</i></b>	Allgemeine Tonussteigerung der glatten Muskulatur
Euphorischer Effekt	
Antiemetische Wirkung (Emetische Wirkung als Früheffekt)	
Miosis („Stecknadelkopfpupillen“)	

Tab.1: Zentrale und periphere Wirkungen des Morphins

Bei dauerhaftem Gebrauch kommt es zu einer Gewöhnung und Toleranzentwicklung. Tagesdosen bis zu 1g Morphin oder anderen Opiaten sind möglich. Die Folge ist eine psychische und physische Abhängigkeit. Auf das plötzliche Absetzen des Opiats folgen bereits nach wenigen Stunden starke Abstinenzsymptome wie Unruhe, Depression und Angstgefühle.

Im weiteren Verlauf treten Durchfälle und starkes Schwitzen, sowie weitere Hinweise für massive vegetative Störungen auf<sup>17)</sup>.

### *2.5 Pharmakokinetische Eigenschaften des Morphins*

Es existieren parenterale, perorale und rektale Applikationsformen für Morphin.

Parenteral wird Morphin in Form einer wässrigen Lösung von Morphinhydrochlorid intramuskulär (i.m.), subcutan (s.c.) oder intravenös (i.v.) appliziert.

Als orale Applikationsformen werden Morphindragees und ein Morphingranulat angeboten. Morphin ist in diesen Arzneiformen als Sulfat in retardierter Form verarbeitet.

In Morphinhaltigen Suppositorien findet ebenfalls Morphinsulfat Verwendung.

Bei parenteraler Applikation ist eine Dosis von 10 mg erforderlich. Den mit 20 bis 30 min schnellsten Wirkungseintritt erhält man bei i.v. Injektion (i.m. und s.c. 60-90 min). Die perorale Anwendung von Morphin erfordert im Vergleich zur parenteralen eine dreifach höhere Dosierung. Dies ist durch einen hohen First Pass Effekt sowie eine 30%-ige Bindung an Plasma- und Muskeleiweiß bedingt. Auch bei peroraler Applikation wird Morphin zügig resorbiert. Die Wirkungsdauer liegt zwischen zwei Stunden (bei i.v. Applikation) und acht Stunden (bei Verabreichung einer oralen Retardform).

In der Niere, dem ZNS, der Lunge und hauptsächlich in der Leber findet die Biotransformation statt, dort wird Morphin an der phenolischen und der alkoholischen Hydroxylgruppe mit Glucuronsäure und Schwefelsäure konjugiert und zum geringen Teil N-demethyliert. Die Ausscheidung erfolgt zu 90% renal und zu 10% biliär. Der besonders bei der peroralen Applikation von Morphin gebildete Metabolit Morphin-6-Glucuronid hat im Gegensatz zu Morphin-3-Glucuronid, das keine Morphinwirkung zeigt, eine vielfach stärkere Wirkung, als das unkonjugierte Morphin<sup>18)</sup>.

## *2.6 Schmerztherapie mit Morphin*

Eine Schmerztherapie mit parenteral appliziertem Morphin erfordert meist einen stationären Aufenthalt. Zu Beginn der Therapie erhält der Patient die erste Injektion; bereits nach kurzer Zeit ist er schmerzfrei. Wird nun mit der nächsten Verabreichung gewartet, bis erneut Schmerzen auftreten, so erfordert die zweite Injektion eine solch hohe Dosis, daß es über die Schmerzfreiheit hinaus zu unerwünschten Nebenwirkungen wie Verwirrtheit und Atemdepression kommt. Bei der Schmerztherapie mit Opioiden gilt deshalb als Grundregel, daß zur Behandlung chronischer Schmerzen die Gabe des Schmerzmittels prophylaktisch, nach einem individuell erstellten Zeitplan erfolgen sollte. Dadurch wird im ZNS ein relativ konstanter Gehalt an Morphin erreicht, der ständige Schmerzfreiheit unter Ausschluß schwerer Nebenwirkungen gewährleistet<sup>19)</sup>. Obwohl durch diese rhythmische Gabe von Morphin eine Schmerzfreiheit erzielt werden kann, stellt sie noch nicht die optimale Therapieform dar. Ideal ist die kontinuierliche Gabe von Morphin z.B. in Form einer Infusion, die jedoch ebenfalls einen stationären Aufenthalt, bzw. das Mitführen eines Infusionsautomaten erfordert. Die Alternativen zu einer Infusion sind nach dem Stand der Technik die bereits erwähnten, Morphinsulfat enthaltenden, oralen Retardformen. Eine sinnvolle Ergänzung zu den bisher erwähnten Applikationsformen wäre daher eine einfache, vom Patienten selbst anzuwendende, pharmazeutische Vorrichtung zur kontrollierten, kontinuierlichen Abgabe von Morphin, die nicht die Aufnahme des Wirkstoffes über den Gastrointestinaltrakt erfordert. Diese Aufgabe wird idealerweise von einem transdermalen therapeutischen System (TTS) gelöst.

In einer von Ahmedzai et. al. durchgeführten Vergleichsstudie wurde opioidpflichtigen Krebspatienten nacheinander eine retardierte, orale Morphin-Arzneiform und ein fentanylhaltiges TTS verabreicht. Bei Fentanyl (**4**) handelt es

sich um ein vollsynthetisch hergestelltes Opioid mit stark schmerzstillender Wirkung. 58,3% der Patienten gaben nach der Studie der transdermalen Arzneiform den Vorzug und 22,3% dem oral applizierten Morphin<sup>20)</sup>.

Aufgrund der großen Akzeptanz transdermaler therapeutischer Systeme wäre eine transdermal anzuwendende Darreichungsform des Wirkstoffs Morphin eine sinnvolle Ergänzung zu bisherigen Behandlungsmöglichkeiten starker Schmerzen.

## 2.7 Transdermale Applikation von Arzneistoffen

### Entwicklung der TTS

Seit 1981, nachdem das erste transdermale therapeutische System mit dem Wirkstoff Scopolamin entwickelt wurde<sup>21)</sup>, sind heute TTS für acht verschiedene Wirkstoffe erhältlich. Diese sind in Tabelle 2 mit je einem Beispiel für ein Handelsprodukt aufgeführt.

Wirkstoff	Handelsname	Indikation
Clonidin	Citapress <sup>®</sup>	Bluthochdruck
Glyceroltrinitrat	Nitroderm <sup>®</sup>	Angina pectoris
Nicotin	Nicorette <sup>®</sup>	Nicotinsucht/Raucherentwöhnung
Scopolamin	Scopoderm <sup>®</sup>	Reiseübelkeit/Kinetosen
Estradiol	Estraderm <sup>®</sup>	Zur Hormonsubstitution
Testosteron	Testoderm <sup>®</sup>	Zur Hormonsubstitution
Estradiol und Norethisteronacetat	Esstracombi <sup>®</sup>	Zur Hormonsubstitution
Fentanyl	Durogesic <sup>®</sup>	Chronische Schmerzen

Tab. 2: Im Handel befindliche TTS und ihre Wirkstoffe

TTS mit folgenden Wirkstoffen befinden sich in der klinischen Testphase: Levonorgestrel<sup>22)</sup>, Physostigmin<sup>23)</sup>, Ketorolac<sup>24)</sup> und Ketoprofen<sup>25)</sup>.

Noch in der Entwicklungs- bzw. frühen Testphase befinden sich TTS mit weiteren Wirkstoffen wie dem ACE-Hemmstoff Captopril<sup>26)</sup>, Terbutalin<sup>27)</sup>, Aspirin<sup>28)</sup> und Oxymorphon<sup>29)</sup>.

Unter den 17 genannten TTS, die entweder noch im Entwicklungsstadium oder einer Testphase bzw. bereits als TTS erhältlich sind, befinden sich fünf mit Substanzen, die in der Schmerztherapie eingesetzt werden. Dieser große Anteil an Schmerzmitteln verdeutlicht das Interesse an der Therapie chronischer Schmerzen mit TTS.

Nur wenige Substanzen sind in der Lage, die menschliche Haut zu durchdringen. Zur Darstellung der Problematik bei der transdermalen Applikation von Arzneistoffen wird zunächst auf den Aufbau der Haut und die Zusammensetzung der einzelnen Hautschichten eingegangen.

### **3. Transdermale Applikation von Morphin**

#### **3.1 Aufbau der Haut**

Die Haut gehört mit ihrer Gesamtfläche von 1,6-2 m<sup>2</sup> zu den größten Organen des menschlichen Körpers. Sie wird in drei Schichten unterteilt. Die Oberhaut (Epidermis) und die Lederhaut (Korium) werden zusammen als Kutis bezeichnet. Unterhalb dieser zwei Schichten befindet sich die Unterhaut (Subkutis)<sup>30)</sup>.

Die Epidermis gliedert sich in vier Schichten. Die unterste Schicht, die Basalmembran, ist für den größten Teil der Epidermisregeneration verantwortlich. Ein Teil der neu entstandenen Zellen durchlaufen in den darauffolgenden 30 Tagen während ihres Weges an die Hautoberfläche unterschiedliche Differenzierungsphasen. Auf die Basalmembran (Stratum basale) folgt das Stratum spinosum, in dem die polygonalförmigen Zellen über Desmosomen miteinander verknüpft sind. Das sich anschließende Stratum granulosum besteht lediglich aus zwei bis fünf Zellschichten. In diesem Stadium besitzen die nun flachen Zellen noch einen kleinen Zellkern und Keratohyalin granula, in denen Ceramide enthalten sind. Nach ihrer Ausdifferenzierung zu Korneozyten bilden die nun zellkernlosen Zellen das Stratum corneum, das die eigentliche Hautbarriere darstellt<sup>31)</sup>. Im Stratum corneum, das eine Dicke von 8,7-12,9 µm hat, sind die Korneozyten bei einer Schichtdicke von 0,5mm wie in einem Mauerwerk in 16 bis 23 Zellschichten angeordnet<sup>32)</sup>. Sie bilden die „Ziegelsteine“ des Mauerwerks. Der „Mörtel“ besteht aus bilamellaren Schichten, in denen sich lipophile und hydrophile Phasen abwechseln. Der Lipidanteil besteht aus Ceramiden, Phospholipiden, Cholesterol und Cholesterolestern<sup>33)</sup>.

### *3.2 Penetration von Arzneistoffen durch die Haut*

Um diese Barriere zu durchdringen stehen neben der Penetration durch die Hautanhangsgebilde wie Schweißdrüsen und Haarfollikel, die jedoch eine untergeordnete Rolle spielen und nur für große, polare Substanzen mit kurzen Diffusionszeiten in Frage kommen, prinzipiell zwei Penetrationsrouten für Arzneistoffe zur Verfügung. Die transzelluläre Route durch die mit Keratin gefüllten Korneozyten, oder die Route entlang der Bilayerschichten des Interzellularraums. Diese passive laterale Diffusion entlang der interzellulären Lipidschicht hat sich als der wahrscheinlichste Permeationsweg für Arzneistoffe herausgestellt, soweit sie eine ausreichende Lipophilie besitzen<sup>34)</sup> Abbildung 2 zeigt skizzenhaft den Aufbau des Stratum corneum und die Penetrationsrouten.

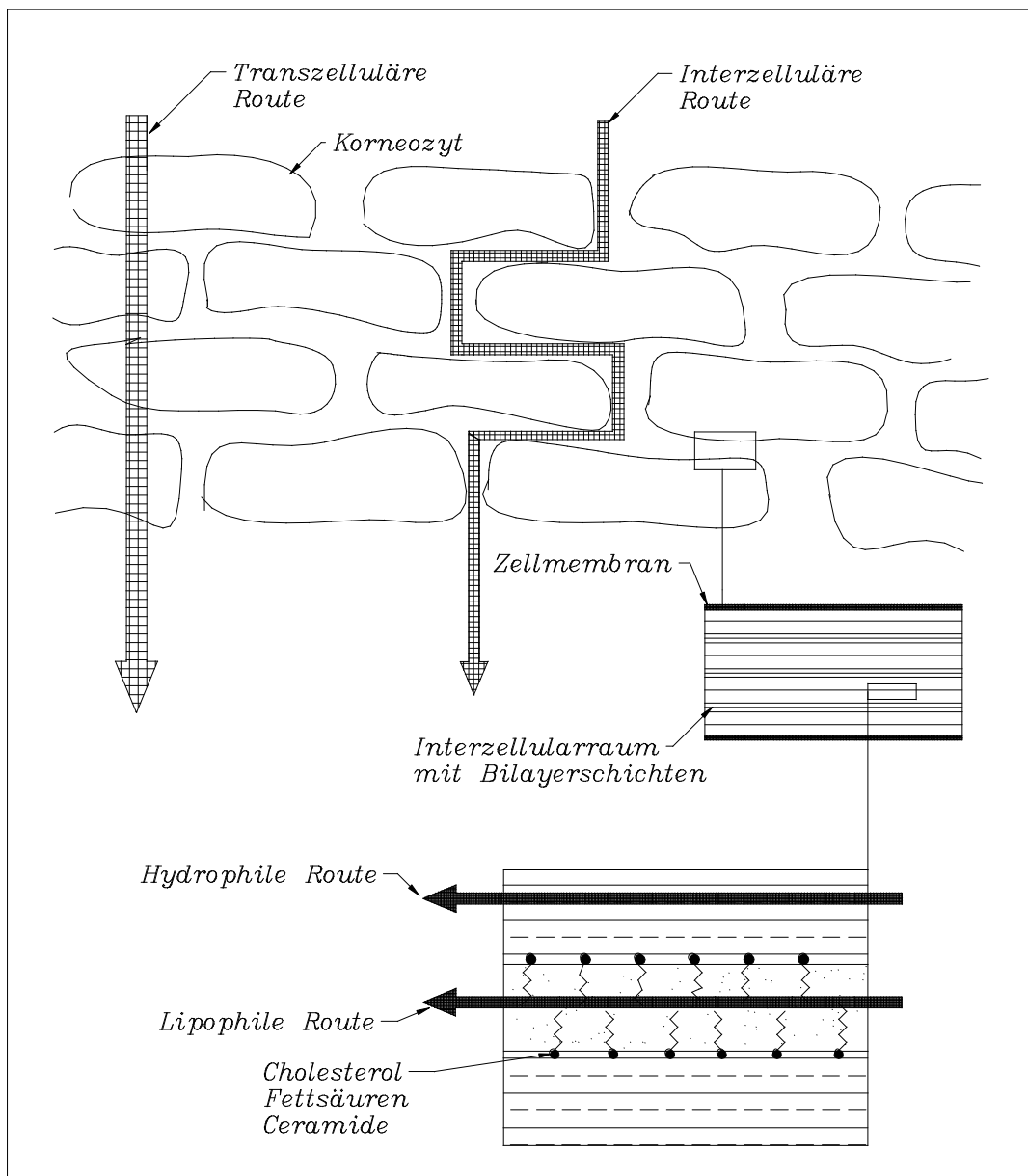


Abb.2: Permeationsrouten durch das Stratum corneum

### 3.3 Faktoren der perkutanen Absorption

Bislang sind nur wenige Arzneistoffe ohne größere Kunstgriffe für die transdermale Applikation geeignet. Die Penetration und anschließende systemische Resorption aus der Haut wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst.



Die Auswahl der Substanzen beschränkt sich auf Wirkstoffe, die bereits in geringen Plasmakonzentrationen von wenigen Nanogramm pro Milliliter einen pharmakologischen Effekt erzielen<sup>35)</sup>.

Die Eliminierungsrate eines Arzneistoffes entscheidet ebenfalls über seine Eignung als Wirkstoff für ein TTS. Eine zu hohe Clearance kann trotz akzeptabler Hautfluxraten zu einer nicht ausreichenden Plasmakonzentration im Steady State Gleichgewicht führen<sup>36)</sup>.

Man unterscheidet drei unterschiedliche Aufbauprinzipien bei TTS. Der erste Typ, das membrankontrollierte TTS, steuert die Freigabe des Wirkstoffes über eine spezielle Membran, die zwischen dem Wirkstoffreservoir und der Adhäsivschicht angeordnet ist. (Abb.3)<sup>37)</sup>

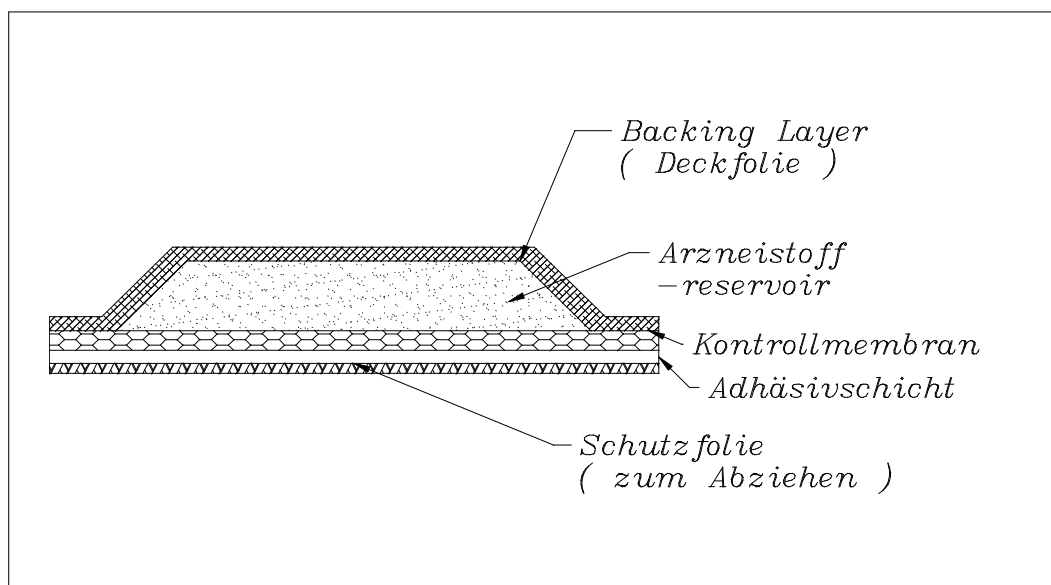


Abb.3: Membrankontrolliertes TTS

Die Membran ist entweder mikroporös, oder nicht porös und besteht -je nach Ausführung- aus unterschiedlichen Polymeren wie z.B. Celluloseestern oder Polyamiden<sup>38)</sup>. Die Freisetzung des Wirkstoffes aus diesem TTS-Typ erfolgt im Idealfall nach einer Kinetik nullter Ordnung. Die Freisetzungsgeschwindigkeit bleibt hierbei über den gesamten Applikationszeitraum konstant.

Bei einem matrixkontrollierten TTS ist der Wirkstoff in einer hydrophilen oder lipophilen Matrix gelöst oder suspendiert, die für eine kontrollierte Freigabe geeignet ist. Die Freigabe erfolgt hier nach einer „Wurzel  $t$ “-Kinetik, d.h. die Freigabegeschwindigkeit aus dem TTS nimmt mit sinkender Wirkstoffkonzentration in der TTS-Matrix ab. (Abb.4).

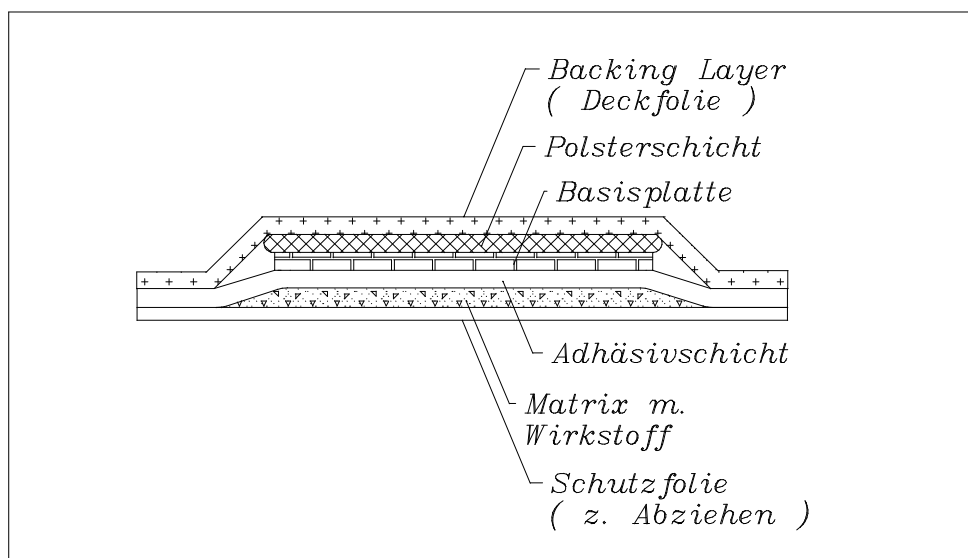


Abb.4 : Matrixkontrolliertes TTS

Mikroreservoir-TTS verfügen über eine Polymermatrix. In dieser Matrix ist der Wirkstoff in viele kleine Flüssigmikroreservoirs eingearbeitet. Das Freisetzungsprinzip entspricht also einer Mischung aus einem membrankontrollierten und einem matrixkontrollierten TTS (Abb. 5).

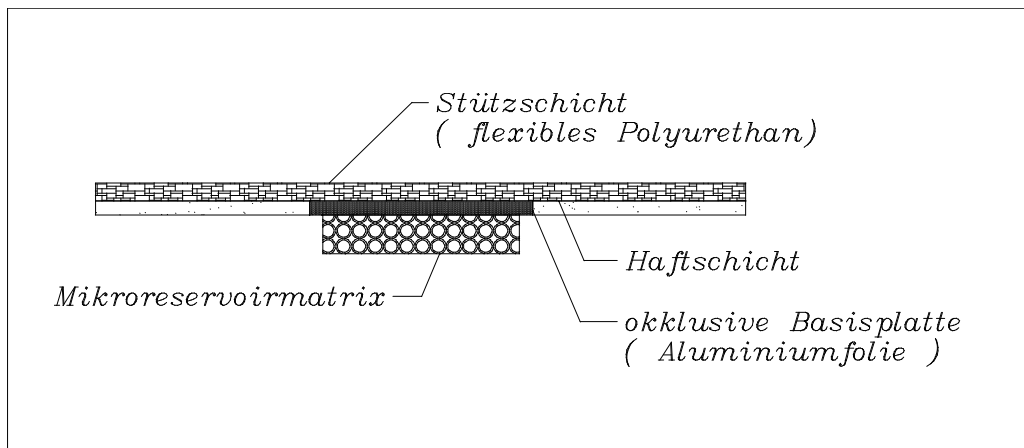


Abb.5: Mikroreservoir TTS

Mit der Verwendung unterschiedlicher TTS-Ausführungen läßt sich die Freisetzung und Resorption von Wirkstoffen aus der Darreichungsform beeinflussen. So ist bei den membrangesteuerten TTS die Diffusion durch die kontrollierende Membran abhängig von der Molekülgröße<sup>39)</sup>.

Zwischen der Adhäsivschicht und dem Stratum corneum, das die eigentliche Barriere für die zu resorbierende Substanz darstellt, findet ein Verteilungsprozess statt. Dieser ist thermodynamisch gesteuert und wird durch das Lösungsverhalten der Substanz und den Konzentrationsgradienten zwischen den beiden Schichten gesteuert.

Bei der Diffusion durch das Stratum corneum hat der Lipophiliegrad einen großen Einfluß auf die Diffusionsgeschwindigkeit. Substanzen mit einer zu hohen

Lipophilie verbleiben im Stratum corneum und verteilen sich nur in geringem Maße auf darunterliegende Hautschichten<sup>40)</sup>.

Während der Diffusion durch das Stratum corneum kann es zu Interaktionen zwischen den penetrierenden Substanzen und Bestandteilen des Stratum corneum kommen. Dadurch wird die Diffusionszeit ebenfalls verlängert<sup>41)</sup>. Da im Stratum corneum Stoffwechselaktivitäten stattfinden, sind Metabolisierungsreaktionen möglich. Diese können einerseits zur Inaktivierung des Arzneistoffes führen, andererseits aber auch die Freisetzung des aktiven Wirkstoffes aus einer applizierten Prodrugform bewirken<sup>42)</sup>.

Nachdem die penetrierende Substanz durch das Stratum corneum diffundiert ist, kommt es zu einem Verteilungsprozess an der Grenze zu tieferen Hautschichten.

Hierbei ist, besonders im Hinblick auf eine anschließende Aufnahme der Substanz in das hydrophile Kapillarsystem, ein ausgewogenes Verhältnis zwischen der Hydrophilie und der Lipophilie der Substanz von Vorteil<sup>43)</sup>.

In der Vergangenheit haben sich solche Substanzen für die Hautpenetration als optimal erwiesen, die einen Verteilungskoeffizient Octanol/Wasser von zwei aufweisen<sup>44)</sup>.

Für größere, geladene Moleküle, die von selbst nur sehr schlecht durch die Haut penetrieren, besteht die Möglichkeit der Iontophorese. Bei dieser Methode wird die Diffusion von geladenen Molekülen durch das Stratum corneum mittels eines angelegten elektrischen Feldes gesteuert. Das elektrische Feld wird mittels zweier Elektroden in der Haut aufgebaut<sup>45)</sup>.

Um die Barriereigenschaften des Stratum corneum zu beeinflussen, werden verschiedene Substanzen wie z.B. Ethanol und Dimethylsulfoxid als sog. Enhancer eingesetzt. Das Funktionsprinzip besteht in Veränderungen der Lipidstruktur in den Bilayerschichten des Stratum corneum. Durch die Einlagerung der Enhancer im Stratum corneum kann die natürliche Molekülanordnung gestört und die

Diffusionsrate für penetrierende Substanzen gesteigert werden<sup>46)</sup>. Diese Manipulation der Haut kann jedoch zu Irritationen führen. Der Enhancer kann aber auch resorbiert werden und pharmakologische Wirkung zeigen. Aus diesem Grund müssen Enhancer neben der erwünschten Penetrationsförderung eine möglichst geringe Toxizität und eine hohe Verträglichkeit aufweisen, sowie sich gegenüber dem Wirkstoff chemisch inert verhalten<sup>34)</sup>.

### *3.4 Transdermale Morphinapplikation*

Ziel der Untersuchungen ist die Erhöhung der Hautpenetration von Morphin zum Zweck der Bereitstellung einer Formulierung zur transdermalen Applikation in der Schmerztherapie. Bei der transdermalen Applikation von Morphin-Base findet sich nur ein sehr geringer Teil des im Freigabesystem enthaltenen Morphins im hydrophilen Akzeptormedium jenseits des Stratum corneum wieder. Dies liegt zum einen an der äußerst geringen Wasserlöslichkeit der Morphin-Base und deren hohem Molekulargewicht, zum anderen aber auch an der strukturbedingten Polarität in unterschiedlichen Bereichen des Moleküls. Die phenolische Hydroxylgruppe bildet gemeinsam mit der alkoholischen Hydroxylgruppe und der Etherbrücke zwischen den C-Atomen 4 und 5 ein polares Zentrum. Dieses ist zur Ausbildung inter- und intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen befähigt. Es bilden sich unter Einbeziehung des zweiten polaren Zentrums im Molekül am basischen Stickstoff polymere Assoziate, die aufgrund ihrer Größe nur in sehr geringem Maße zur Hautpenetration befähigt sind. Dieser Umstand erklärt eine Erhöhung der Penetrationsrate bei der Verwendung deuterierter Wirkstoffe. Es konnte gezeigt werden, daß der Austausch der Hydroxylgruppenwasserstoffe gegen Deuterium die Penetrationrate von Morphin durch Meerschweinchenhaut signifikant erhöht<sup>47)</sup>. Das liegt zum einen an der höheren Lipophilie der O-D-

Gruppe und zum anderen an der Tatsache, daß das Deuteromorphin das Deuterium gegen Wasserstoff zurücktauscht, sobald es ins wässrige Milieu gelangt. Mit der lipophilen Tarnkappe Deuterium penetriert es das lipophile Stratum corneum, um sie nach dessen Passage wieder abzulegen und sie gegen den in der Hydroxylgruppe hydrophileren Wassertstoff wieder zu wechseln. Damit wäre auch ein Stofftransport im ruhenden System möglich, da sich kein Gleichgewicht ausbilden kann.

Im Codeinmolekül liegt anstelle der phenolischen Hydroxylgruppe eine Methyletherfunktion vor. Neben der veränderten pharmakologischen Wirkung besitzt Codein auch andere physikochemische Eigenschaften. Durch die Methylethergruppe am C6 können sich keine Wasserstoffbrücken in dem Maße bilden, wie es bei Morphin zu beobachten ist. Der Schmelzbereich von Codein liegt deshalb mit 155-158 °C um ca.100 °C tiefer als der der Morphin-Base. Daraus resultiert eine erhöhte Hautpermeabilität<sup>48)</sup>. Der Zusammenhang zwischen Schmelzpunkt und Hautfluxrate von Molekülen konnte bereits 1977 von Higuchi gezeigt werden. Danach permeieren Substanzen mit niedrigerem Schmelzpunkt besser durch das Stratum corneum als Substanzen mit hohem Schmelzpunkt<sup>49)</sup>. Daß dies nicht für Salze zutrifft, läßt sich am Beispiel des Morphinhydrochlorids zeigen. Durch die Protonierung des basischen Stickstoffs am Morphin wird die Bildung der polymeren Assoziate behindert, da die Wasserstoffbrückenbindungen nicht denen im Morphin entsprechen. Obwohl der Schmelzpunkt dadurch sinkt (Morphinhydrochlorid hat einen Schmelzpunkt von 200 °C), kann eine Steigerung der Wirkstoffpermeation bei der Applikation von Morphinhydrochlorid nicht festgestellt werden. Begründet wird dies mit der entstandenen ionischen Ladung. Um die Hautfluxrate signifikant zu erhöhen, muß also die Bildung polymerer Assoziate verhindert, gleichzeitig aber die polaren Molekülteile oder ionische Ladungen des Moleküls nach außen abgeschirmt werden. Da die Morphin-Base mit

Säurebestandteilen der Haut im Sinne einer Säure-Base Reaktion reagieren kann, würde die Protonierung des Morphins bei transdermaler Applikation nur in Anwesenheit eines Puffers vollkommen unterdrückt. Die Manipulation des hauteigenen pH-Milieus durch die Anwendung von Puffern könnte jedoch zu unerwünschten Hautirritationen führen. Eine Hemmung der Hautpermeation durch Salzbildung kann also nicht ohne die Gefahr von Nebenwirkungen unterdrückt werden. Beeinflussung von pKs- Werten bzw. Ionenpaarbildung können sich auch auf die Hautpenetrationseigenschaften von Substanzen auswirken<sup>50)</sup>. So wäre die erhöhte Hautfluxrate von Indometacin, einem Antirheumatikum, in Anwesenheit von Diisopropylamin durch die Bildung eines Ionenpaars zu erklären<sup>51)</sup>.

Analog dem Deuteromorphin sollten sich bei der Penetration Morphiniumsalze organischer Carbonsäuren verhalten. Bei der Passage des lipophilen Teils des Stratum corneum liegen sie als Ionenpaar vor, wobei die Ionenbeziehung gut durch den lipophilen Rest der Carbonsäure abgeschirmt wird. Sobald das Ionenpaar aber wässriges Milieu erreicht, erfolgt Solvatisierung und schneller Abtransport. Auf diese Weise sollte keine Gleichgewichtseinstellung an der Membran möglich sein und ein erhöhter Flux resultieren. Diese Idee sollte im Weiteren näher untersucht werden.

#### 4. Untersuchung der Hautpermeation unterschiedlicher Morphiniumsalze

##### 4.1 Die Diffusionszelle

Um zu untersuchen, inwieweit der org. Carbonsäurerest die Hautpermeation von Morphiniumsalzen beeinflusst, wurden verschiedene Morphiniumsalze hergestellt und in einem Tylose-FreisetzungsmEDIUM auf Meerschweinchen-Hautstanzlinge aufgebracht. Die Stanzlinge waren während des Versuches in einer modifizierten und weiterentwickelten Diffusionszelle aus Glas nach Keshory und Chien eingespannt (Abb.6)<sup>52)</sup>.

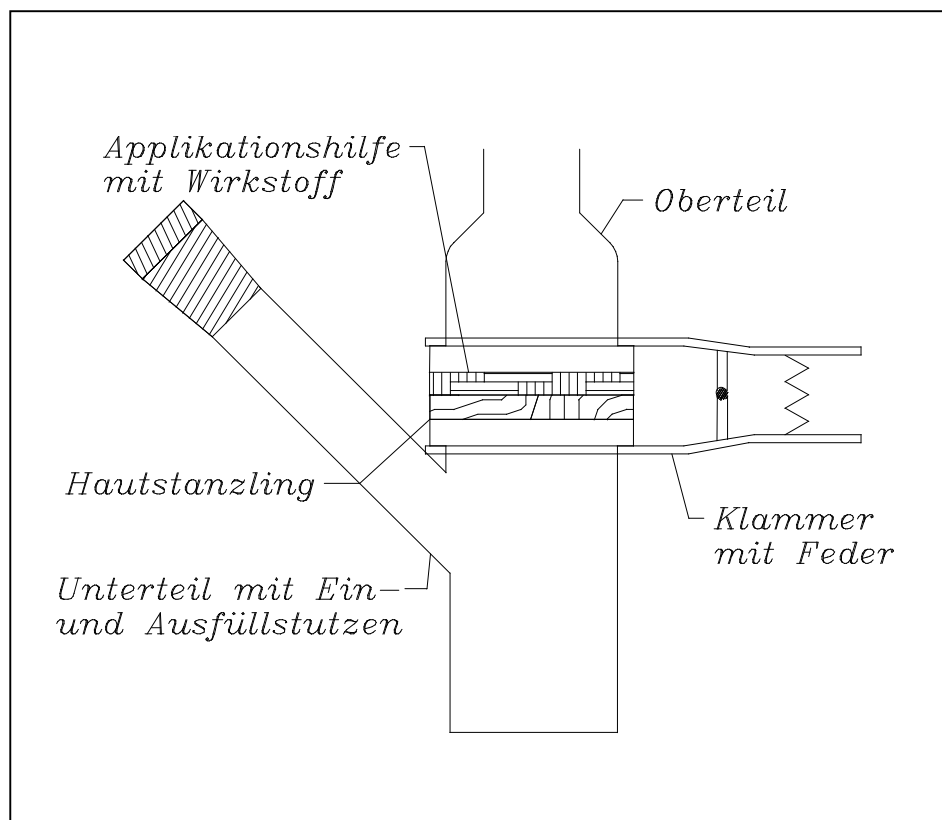


Abb.6: modifizierte Diffusionszelle nach Keshory und Chien

Durch den Füllstutzen am Zellenunterteil wird während der Meßzeit dreimal das Akzeptormedium ausgetauscht. Auf diesem Weg wird eine Rückdiffusion von Wirkstoff in die Haut vermieden und „Sink“-Bedingungen geschaffen, unter denen,



wie in vivo, permeierter Wirkstoff vom Diffusionsort abtransportiert wird. Um physiologischen Bedingungen nahezukommen wird als Akzeptormedium eine auf 37 °C temperierte, isotonische Kochsalzlösung verwendet. Zur Erfassung der Permeationsmenge wird der Gehalt der insgesamt vier Proben mit HPLC UV-spektroskopisch bestimmt. Die Gesamtpermeationsmenge ergibt sich aus der Addition (Kumulation) der Einzelmengen.

#### *4.2 Untersuchung der Permeationsrate von Morphin-Base und fünf Morphiniumsalzen organischer Carbonsäuren*

Das Diagramm in Abbildung 7 zeigt den Verlauf der Hautpermeation unterschiedlicher Morphiniumsalze über einen Zeitraum von 48 Stunden.

Es wurden die in der Legende aufgeführten organischen Carbonsäuresalze verwendet. Entsprechend den entwickelten Ideen wurden in einem ersten Versuch zunächst Morphinsalze aromatischer Carbonsäuren hergestellt und deren Freisetzung über einen Zeitraum von 48 Stunden untersucht.

Wie aus dem Diagramm ersichtlich, zeigte dabei die Morphin-Base die geringste Permeationseigenschaft. Diese wird durch das Nicotinat erheblich gesteigert und erreicht mit dem 4-Aminobenzoat bereits den doppelten Wert. Das 2,4,6-Trimethylbenzoat verhält sich nur geringfügig besser. Jedoch ist mit dem Benzoat eine dramatische Steigerung verbunden, die mit dem 4-Brombenzoat, das eine mehr als achtfache Penetration zeigt, ihren Abschluß findet.

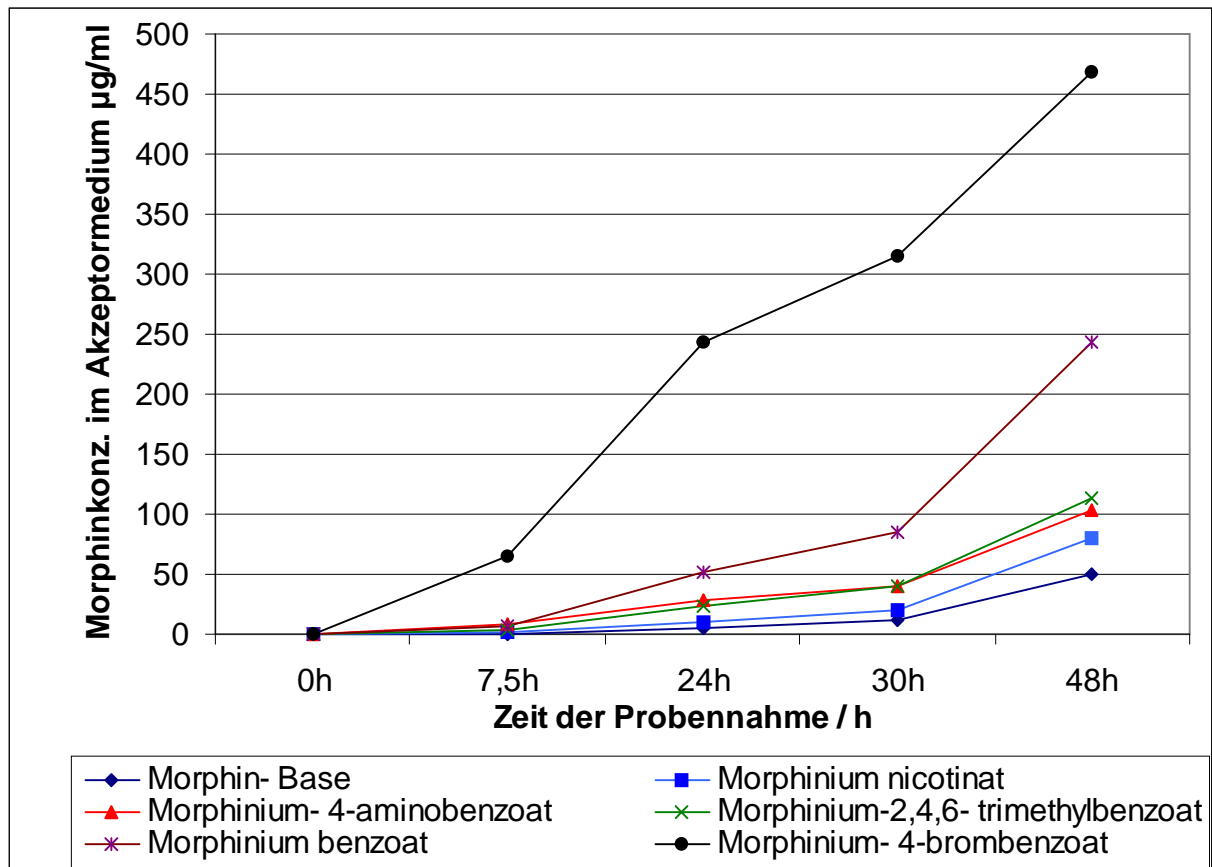


Abb. 7: Diagramm der mittleren Morphinkonzentrationen im Akzeptormedium nach Applikation von Morphin-Base und verschiedenen Morphiniumsalzen auf Meerschweinchenhaut aus einem Tylose Wasser Donormedium

Tabelle 3 zeigt die gemittelten, kumulierten Morphinkonzentrationen im Akzeptormedium zum Zeitpunkt der Probennahme.

	Morphin-base	Morphinium-nicotinat	Morphinium-4-aminobenzoat	Morphinium-trimethylbenzoat	Morphinium-benzoat	Morphinium-4-brombenzoat
7,5h	0,3	1,72	9,15	3,9	7,05	64,6
24h	5,7	10	28	23,3	51	243
30h	12,75	20,3	40,4	39,7	85,4	315
48h	49,5	79,9	104	112,86	243	468

Tab.3: Morphinkonzentrationen im Akzeptormedium in µg/ml

Deutlich ist eine Erhöhung der Hautpermeation von Morphin durch die Verwendung der unten aufgeführten Carbonsäuresalze zu beobachten. Koch konnte zeigen, daß diese Permeationssteigerung nicht auf einen Enhancereffekt zurückzuführen ist. Zu diesem Zweck wurde Acetylsalicylsäure in der oben beschriebenen Weise auf ihre Hautpermeationseigenschaften hin untersucht. Auf drei Hautstanzlinge wurde ausschließlich Acetylsalicylsäure in einem Donormedium aufgetragen, bei weiteren drei Stanzlingen wurde zusätzlich eine dem Acetylsalicylsäuregehalt äquivalente Menge Benzoesäure dem Donormedium hinzugefügt. Um eine hydrolytische Zersetzung der Acetylsalicylsäure während des Versuches zu verhindern, wurde Dimethylisobutylid als Donormedium verwendet. Es konnten keine signifikanten Steigerungen der Hautpermeation von Acetylsalicylsäure in Anwesenheit von Benzoesäure festgestellt werden <sup>48)</sup>.

Es lag die Vermutung nahe, daß die Steigerung der Permeation von Morphin durch das Stratum corneum und die darunterliegenden Hautschichten auf direkte Interaktionen zwischen dem Säuremolekül und der Morphin-Base zurückzuführen ist. An erster Stelle steht in diesem Zusammenhang die Entstehung einer ionischen Bindung durch die Protonierung des basischen Stickstoffs im Morphinmolekül. Das entstandene Ionenpaar weist somit andere physikochemische Eigenschaften auf als die Ausgangsverbindungen Morphin und die organische Carbonsäure. Dieser Umstand erlaubt es dem Salz, sich bei der Passage durch die unterschiedlichen Hautschichten dem jeweiligen Milieu anzupassen und so eine höhere Phasendiffusionsrate zu erlangen. Zur Bestätigung dieser Vermutung wurde das Diffusionszellenmodell verlassen. Es wurde ein System entwickelt, das zum einen den Einfluß biologischer und metabolischer Faktoren, wie sie bei der Verwendung von natürlicher Haut nicht auszuschließen sind, vermeidet <sup>53)</sup>, aber zum anderen die Phasenübergänge beim Durchqueren der Haut vereinfacht simuliert.

Weiterhin sollte durch dieses Modell die geringe Präzision der bisher ermittelten Permeationswerte, die aus der Anwendung des biologischen Systems Haut resultiert, umgangen werden. Weitere Vorteile eines solchen Systems sind die niedrigeren Kosten und ein geringerer experimenteller Aufwand, der aus dem Wegfall der Gewinnung, Präparation, Konservierung und Entsorgung der natürlichen Haut resultiert.

## **5. Entwicklung eines Dreiphasensystems als Modell für die Permeation von Wirkstoffen durch die Haut.**

### *5.1 Das U-Rohrmodell*

Zur Simulation der Hautpermeation von Substanzen wurde ein U-förmig gebogenes Glasrohr verwendet (Abb.8). Der mit reinem, wassergesättigtem Chloroform gefüllte Bogen stellt die lipophile Phase des Stratum corneum dar. Einer der beiden Schenkel wird mit einer wässrigen Phase, in welcher der Wirkstoff gelöst bzw. suspendiert vorliegt, befüllt. Somit dient diese Phase als Donorphase. Die Verteilung der zu untersuchenden Substanz zwischen dieser wässrigen und der Chloroformphase stellt den Übergang aus einem hydrophilen Donormedium wie Tylose/Wasser in das Stratum corneum dar. Nach der Diffusion durch dieses simulierte Stratum corneum kommt es wiederum zur Verteilung zwischen dieser Phase und einer weiteren hydrophilen Phase im zweiten Schenkel, die als Akzeptophase Wasser enthält. Sie stellt das Kapillarsystem der unteren Hautschichten dar, in das die Substanz zur systemischen Verteilung aufgenommen werden muß. Aus dieser Phase werden im Verlauf der Untersuchung in definierten Zeitabständen Proben entnommen und auf ihren Morphingehalt untersucht. Dies geschieht per HPLC mit UV-spektroskopischer Detektion ( im Falle von Morphin bei 220 nm). Als Methode dient hierbei eine modifizierte Version der Bestimmung des Morphingehaltes in Opium nach DAB 10, bei der Natriumdodecylsulfat als Ionenpaarreagenz auf RP-Phase verwendet wird. Zur Annäherung an physiologische Eigenschaften wurde das System über den gesamten Meßzeitraum im Wasserbad auf 37°C temperiert.

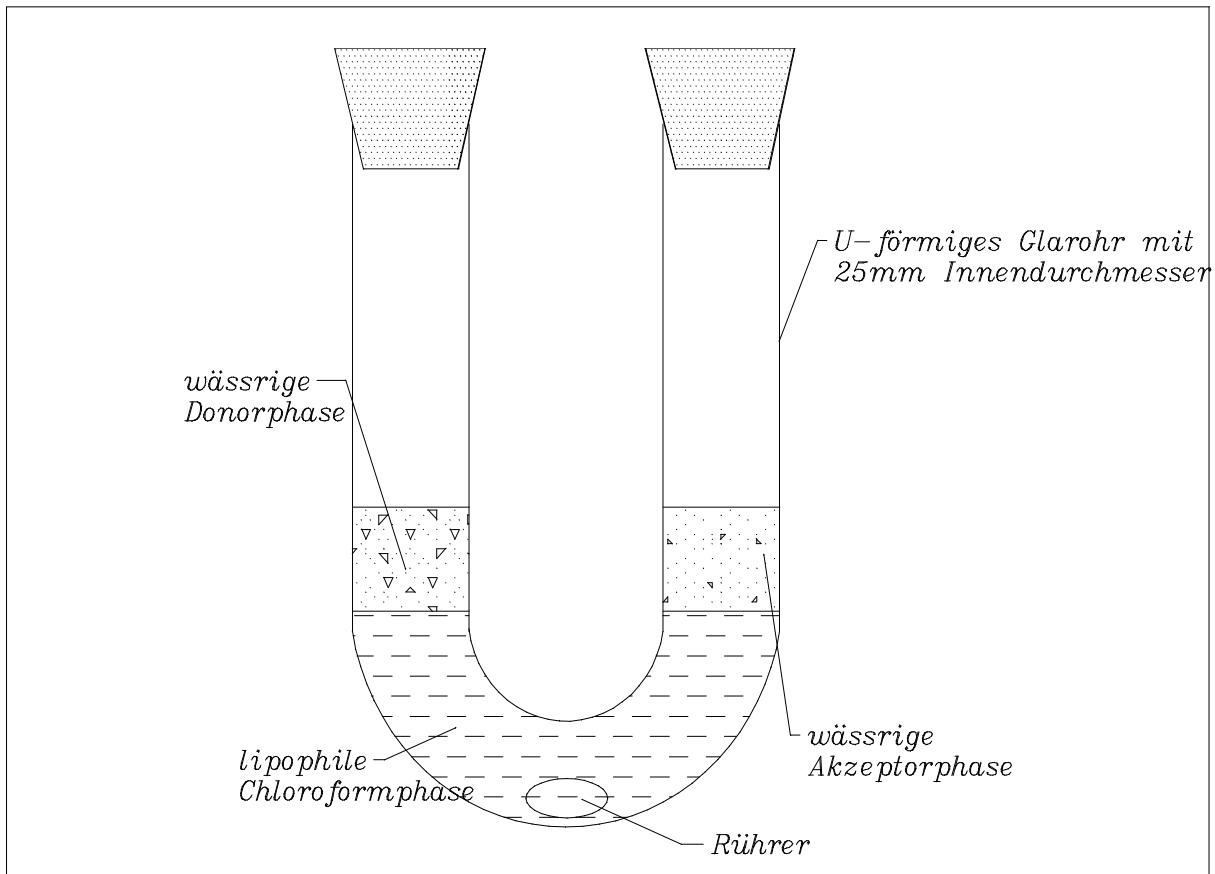


Abb.8: U-Rohrmodell zur Simulation der Permeation von Substanzen durch das Stratum corneum

Lehn und Kirch verwandten ein ähnliches System zur Untersuchung des Transports von Alkalimetall-Kationen durch eine lipophile Phase als supramolekulare Komplexe mit makrobicyclischen Carriern<sup>54)</sup>.

Abbildung 8 zeigt den Aufbau des beschriebenen Modells.

Die Zeiträume der Entnahme von Proben zur Bestimmung der permeierten Morphinmenge wurden entsprechend den Entnahmezeitpunkten bei der Versuchsreihe mit natürlicher Haut gewählt. So konnte der Verlauf der Permeation in beiden Systemen miteinander verglichen werden.

Das Diagramm in Abbildung 9 und die zugehörigen Zahlenwerte der Tabelle 4 zeigen die Zunahme der Morphinkonzentration im Akzeptormedium über einen Zeitraum von 48 Stunden mit den gleichen Morphinsalzen wie im Hautmodell. Wie bei der Permeation durch Meerschweinchenhaut erhält man bei der Verwendung reiner Morphin-Base die geringste Morphinkonzentration im Akzeptormedium. Eine Steigerung um den Faktor 1,8 zeigt das Nicotinat. Mit einer um mehr als das fünffache höher liegenden Morphinkonzentration folgt das 4-Aminobenzoat, übertroffen durch das Benzoat mit der nahezu zehnfachen permeierten Morphinmenge die noch durch das 2,4,6-Trimethylbenzoat und das 4-Brombenzoat mit über zehnfacher Morphinkonzentration im Akzeptormedium gesteigert wird.

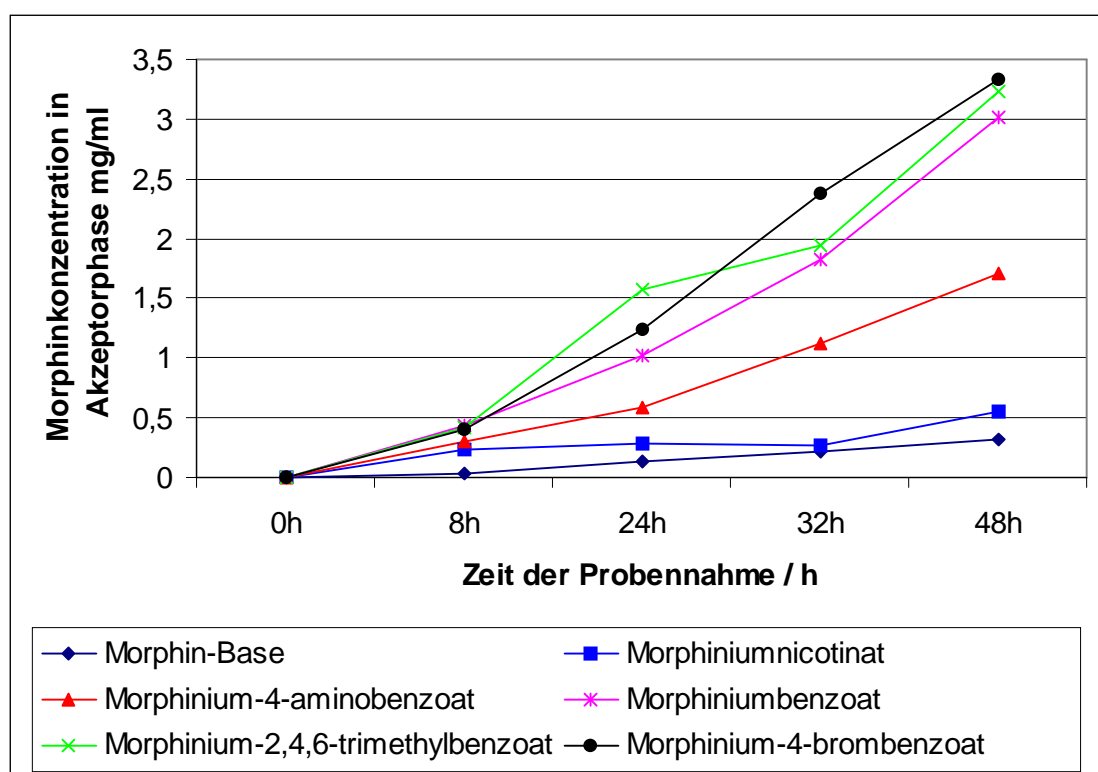


Abb.9: Diagramm der Zunahme der Morphinkonzentration in der Akzeptorphase bei Verwendung von Morphin-Base und verschiedener Morphiniumsalze im U-Rohrmodell.

	Morphin-Base	Morphinium-nicotinat	Morphinium-4-Aminobenzoat	Morphinium-Benzoat	Morphinium-2,4,6-trimethylbenzoat	Morphinium-4-Brombenzoat
0 h	0	0	0	0	0	0
8 h	0,04	0,24		0,43	0,42	0,4
24 h	0,13	0,29	0,59	1,02	1,58	1,24
32 h	0,21	0,26		1,82	1,95	2,37
48 h	0,31	0,55	1,71	3,02	3,24	3,33

Tab. 4: Gehalt an Morphin in der wässrigen Akzeptorphase (mg/ml)

### 5.2 Vergleich der Permeationsresultate an Meerschweinchenhaut mit denen des U-Rohrmodells.

Die bereits im Diffusionszellenmodell erzielten Ergebnisse konnten auch mit diesem Modell, bei dem die Haut durch eine Chloroformphase ersetzt ist, nachvollzogen werden. Auch hier wird durch die Verwendung organischer Carbonsäuresalze des Morphins die Permeationsrate gesteigert, wie die Morphinkonzentrationen im wässrigen Akzeptormedium zeigen. Zur Darstellung der Korrelationsfähigkeit des Modells zur Diffusionszelle wurde die Rangfolge der erzielten Morphiniumkonzentrationen beider Meßreihen gegenübergestellt. Die Abbildungen 10 und 11 zeigen in zwei Balkendiagrammen die Meßergebnisse der beiden Methoden. Bis auf die unterschiedlichen Permeationswerte für Morphiniumtrimethylbenzoat, die bei der Flüssigmembranmethode relativ höher lagen, lassen sich die Ergebnisse der beiden Methoden vergleichen.

Es ist also möglich, durch das Flüssigmembranmodell eine Vorhersage für das Hautpermeationsverhalten von Morphiniumsalzen organischer Carbonsäuren aus einem hydrophilen Donormedium wie Tylose/Wasser zu machen. Eine Vorauswahl der Salze nach der beschriebenen Methode führt zu einer Zeit- und Kostenersparnis und ist jederzeit reproduzierbar, was aufgrund großer Schwankungen der Permeationseigenschaften natürlicher Haut beim Diffusionszellenmodell nicht so einfach möglich ist.



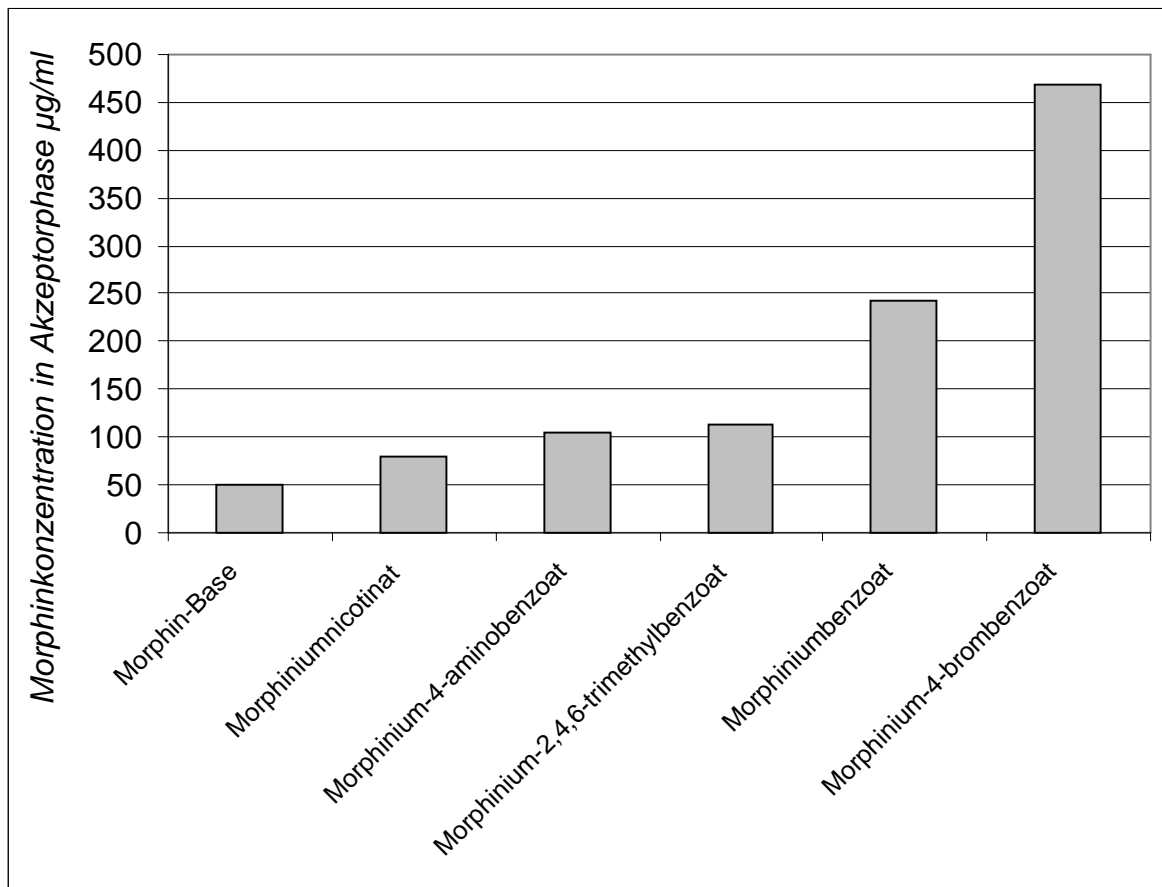


Abb.10: Balkendiagramm mit dem Gesamtmorphingehalt nach 48 Stunden Hautpermeation (µg/ml)

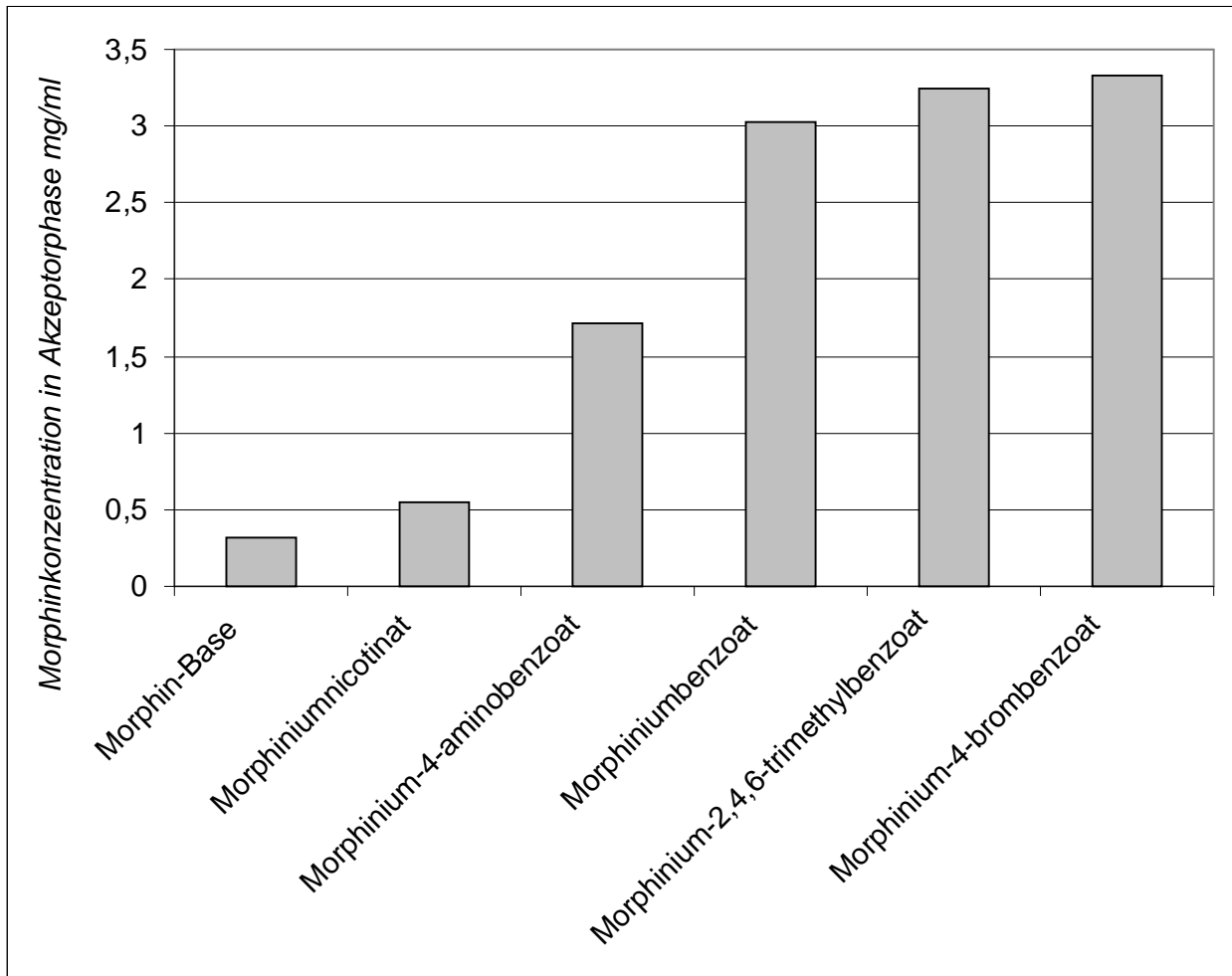


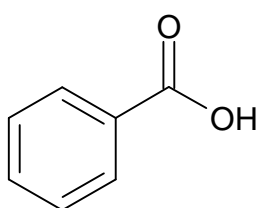
Abb.11: Balkendiagramm mit dem Gesamtmorphingehalt nach 48 Stunden  
Flüssigphasenpermeation (mg/ml)

Um festzustellen, ob diese Permeationssteigerung auch bei der Verwendung anderer organischer Carbonsäuresalze erfolgt, wurden weitere Morphiniumsalze hergestellt und im Dreiphasenmodell auf ihre Permeationseigenschaften untersucht.

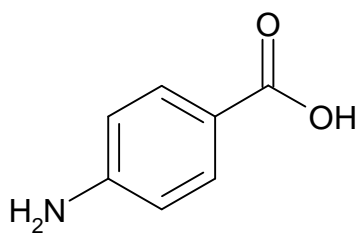
### 5.3 Auswahl weiterer Carbonsäuren zur Herstellung von Morphiniumsalzen und deren Permeationsverhalten im U-Rohrmodell

Durch die Verwendung verschiedener organischer Carbonsäuren mit unterschiedlichen Resten konnte nach einer Relation zwischen Säurereigenschaften wie dem Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten bzw. der Acidität und dem Permeationsverhalten des entsprechenden Morphiniumsalzes gesucht werden. Dazu wurden Säuren mit aromatischen, aliphatischen und heterocyclischen Säureresten ausgewählt. Ein besonderes Interesse lag bei der Verwendung analgetisch wirksamer Arzneistoffe mit Säurefunktion. Diese können bei systemischer Resorption neben dem permeationsfördernden Effekt zusätzlich zu Morphin eine analgetische Wirkung entfalten. In diesem Fall wäre die Anwendung pharmazeutisch akzeptabler Morphiniumsalze von doppeltem Nutzen. Im Folgenden sind die freien Säuren der eingesetzten Salze, nach ihrem Säurerest geordnet, aufgeführt.

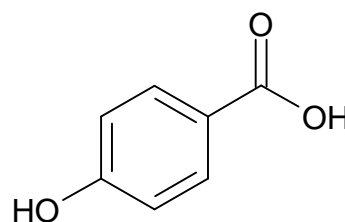
#### 1.) Benzoessäurederivate:



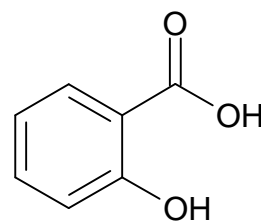
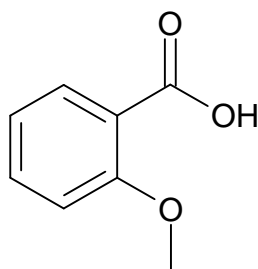
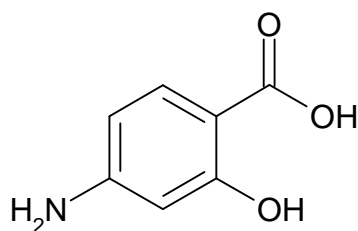
Benzoessäure (5)



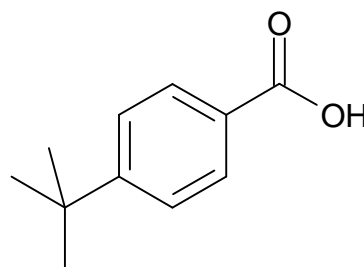
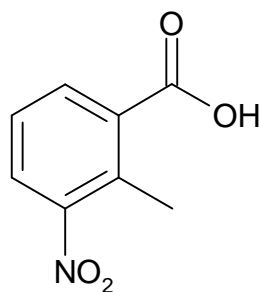
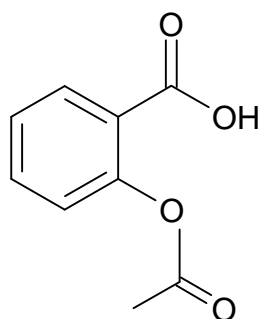
4-Aminobenzoessäure (6)



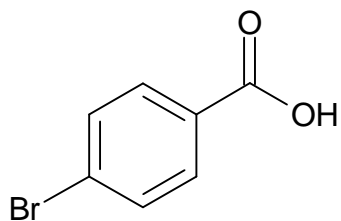
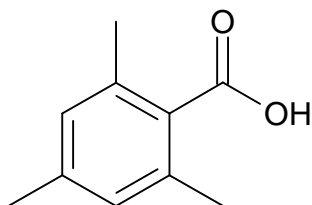
4-Hydroxybenzoessäure (7)



4-Amino-2-hydroxybenzoic acid (8) 2-Methoxybenzoic acid (9) 2-Hydroxybenzoic acid (10)  
( Salicylic acid)



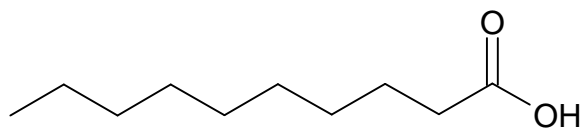
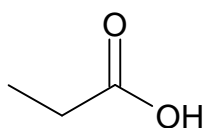
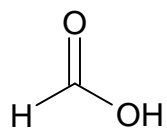
Acetylsalicylic acid (11) 2-Methyl-3-nitrobenzoic acid (12) 4-tert-Butylbenzoic acid (13)



2,4,6-Trimethylbenzoic acid (14)

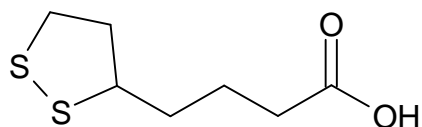
4-Bromobenzoic acid (15)

## 2.) Aliphatische Carbonsäuren:

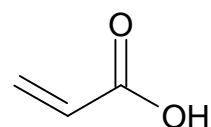


Formic acid (16) Propionic acid (17)

Decanoic acid (18)  
(Capric acid)

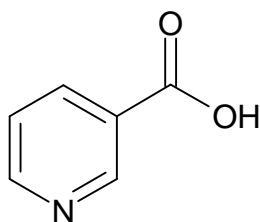


1,2-Dithiolan-3-valeriansäure (19)  
( D,L-α-Liponsäure)



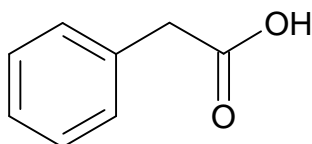
Acrylsäure (20)

### 3.) Säuren mit Heterocyclischen Resten

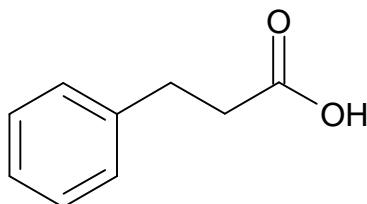


Nicotinsäure (21)

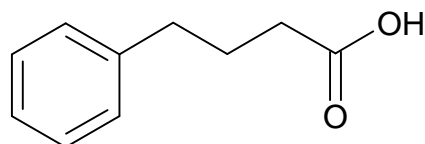
### 4.) Sonstige Arylcarbonsäuren



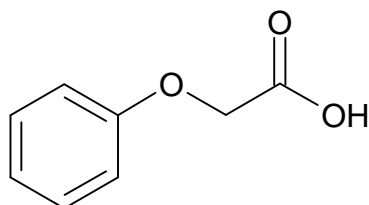
Phenylessigsäure (22)



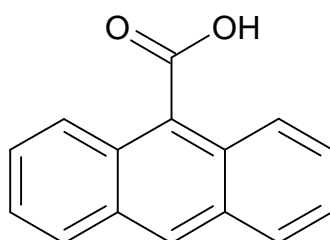
3-Phenylpropionsäure (23)



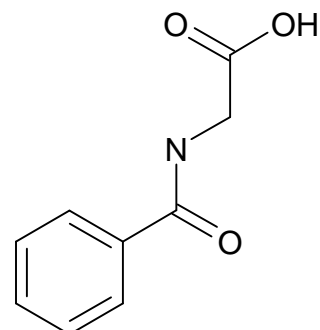
4-Phenylbuttersäure (24)



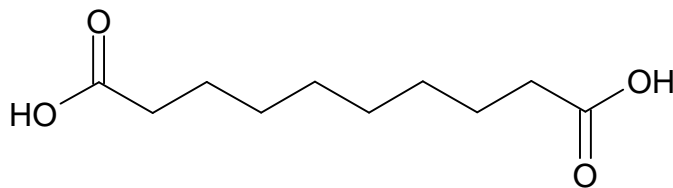
Phenoxyessigsäure (25)



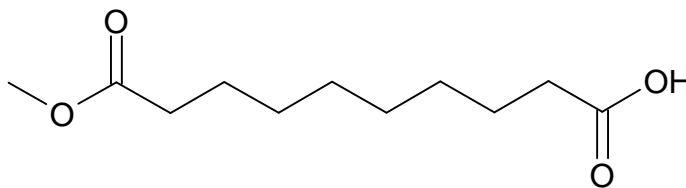
Anthracen-9-carbonsäure (26)



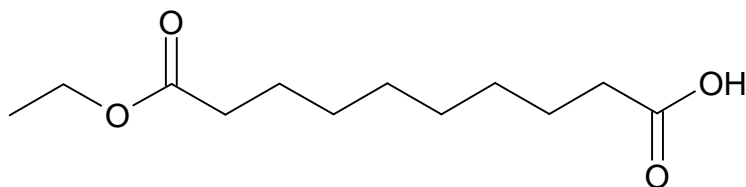
Hippursäure (27)

5.) Aliphatische Dicarbonsäuren und deren Monoester

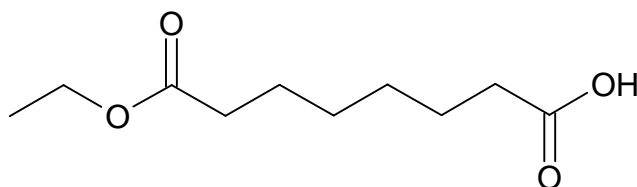
Sebacinsäure (28)



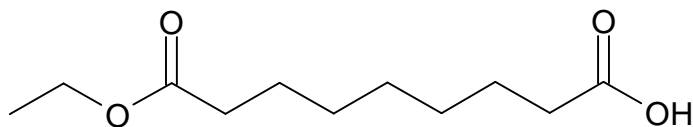
Sebacinsäuremonomethylester (29)



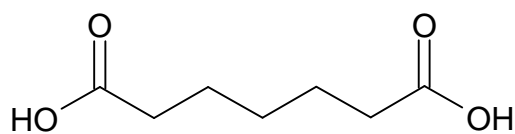
Sebacinsäuremonoethylester (30)



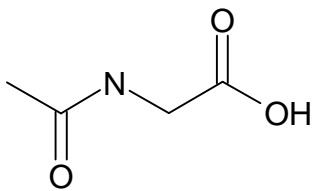
Suberinsäuremonoethylester (31)



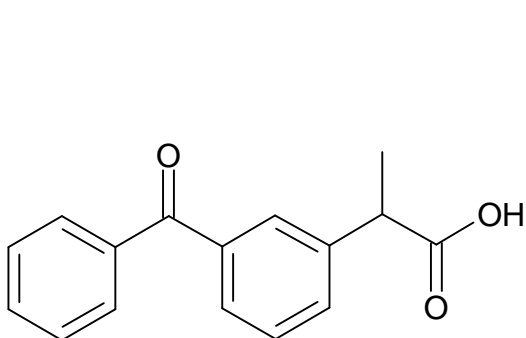
Azealinsäuremonomethylester (32)



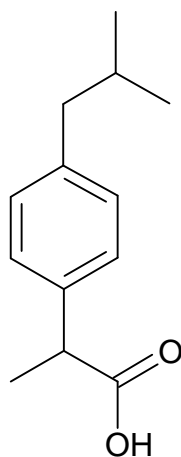
Pimelinsäure (33)

6.) Sonstige nichtaromatische Säuren

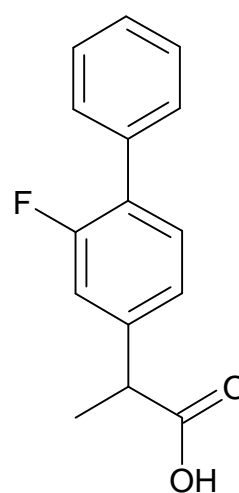
N-Acetylglycin (34)

7.) Carbonsäuren mit analgetischer Wirkung7.a) Arylpropionsäureanalgetika

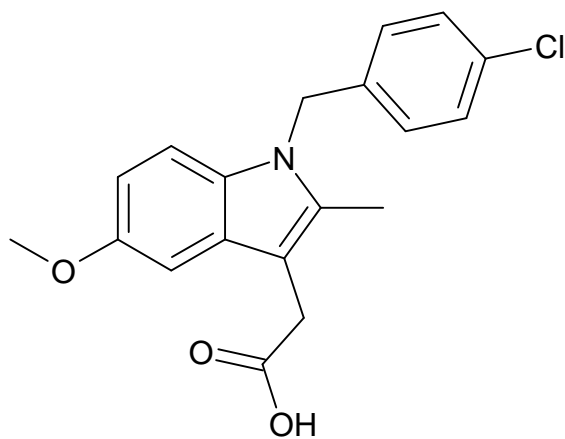
Ketoprofen (35)



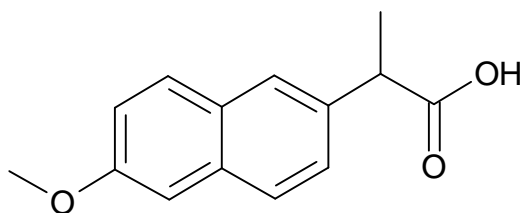
Ibuprofen (36)



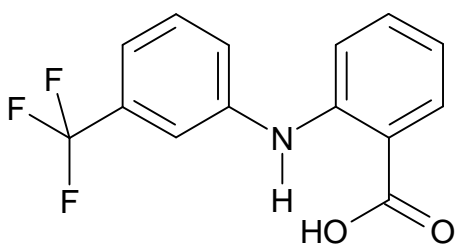
Flurbiprofen (37)

7.b) Arylessigsäurederivate7.c) Heteroarylpropionsäureanalgetika

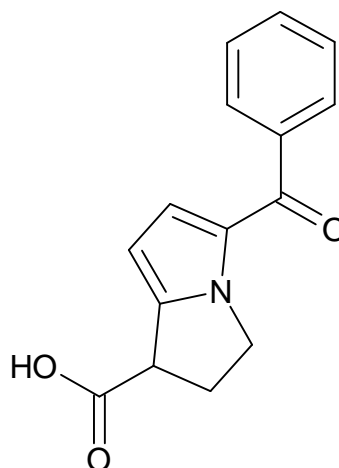
Indometacin (38)



Naproxen (39)



Flufenaminsäure (40)



Ketorolac (41)

Die nach 48 Stunden gemessene Gesamtmorphinmenge in der wässrigen Akzeptorphase wurde hierfür zum Vergleich herangezogen. In Tabelle 5 sind die Salze in ihrer Permeationsrangfolge aufgeführt.

Bis auf fünf Säuren, die den Schluß der Tabelle bilden, konnte durch Morphiniumsalzbildung aller übrigen genannten Säuren eine Permeationssteigerung im Vergleich zur Morphin-Base erzielt werden. Jedoch ist das Ausmaß der Steigerung je nach Morphiniumsalz unterschiedlich. So bildet das 4-Brombenzoat gemeinsam mit dem 2,4,6-Trimethylbenzoat und dem Benzoat eine Spitzengruppe mit einer Morphinkonzentration im Akzeptormedium nach 48 Stunden von über 3mg/ml, was ungefähr dem zehnfachen Wert der Morphin-Base entspricht.

Das Morphiniumphenylacetat und das Morphinium-2-methyl-3-nitrobenzoat liegen beide mit jeweils über 2 mg/ml Morphinkonzentration im Akzeptormedium noch um mehr als 0,3 mg/ml über den nächsten Salzen in der Rangfolge, dem Morphinium-4-aminobenzoat und dem -salicylat mit 1,71 mg/ml. Die weitere Rangfolge der Morphiniumsalze zeigt in der Abnahme der Morphinkonzentration im Akzeptormedium keine größeren Sprünge mehr auf. Sie nimmt von 1,6 mg/ml Morphin im Akzeptormedium beim Phenoxyacetat bis zu 0,068 mg/ml beim Formiat kontinuierlich ab.



Die in einer weiteren Spalte aufgeführten Molekulargewichte der freien Säuren zeigen, daß keine Relation zwischen dem Permeationsverhalten des Salzes und dem Molekulargewicht der freien Säure besteht. So hat beispielsweise das 4-Brombenzoat die beste Permeationseigenschaft und ein Molekulargewicht von 486. Das in der Rangfolge an drittletzter Stelle liegende Dinitrobenzoat besitzt ein ähnliches Molekulargewicht (497). Vergleicht man die im Diffusionszellen- und Dreiphasenmodell (U-Rohrmodell) gemessenen Permeationswerte der fünf Salze mit den restlichen aus der Tabelle 5, so wird ersichtlich daß die Hautpermeation von ionischen Verbindungen -im Gegensatz zu ungeladenen Molekülen- nicht vom Molekulargewicht abhängig ist. Dies gilt zumindest bis zu einem Bereich von 642, was dem Molekulargewicht des größten Morphiniumsalzes, dem Indometacinat, entspricht

Ob die Permeationsteigerungen im Zusammenhang mit physikochemischen Eigenschaften der jeweiligen Säure stehen, und ob auf diesem Weg eine Vorauswahl der einzusetzenden Säuren möglich ist, sollte durch die Berechnung, bzw. Bestimmung des Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten und des  $pK_s$  – Wertes der Säuren untersucht werden.

<b>Morphiniumsalz</b>	<b>In Akzeptorphase diffundierte Menge Morphin (nach 48h) in mg/ml</b>	<b>Molekulargewicht der freien Säure</b>
4-Brombenzoat	3,33	201,03
Trimethylbenzoat	3,24	164,20
Benzoat	3,024	122,12
Phenylacetat	2,173	136,15
2-Methyl-3-Nitrobenzoat	2,06	181,15
4-Aminobenzoat	1,71	137,14
Salicylat	1,71	138,12
Phenoxyacetat	1,60	152,15
Ketorolacat	1,58	215,27
$\alpha$ -Liponat	1,47	206,33
Ketoprofenat	1,16	254,29
Naproxenat	1,02	231,27
Monomethylsebacat	1,0	216,28
3-Phenylpropionat	0,96	150,18
4-Phenylbutanat	0,958	164,20
Sebacat	0,92	202,25
2-Methoxybenzoat	0,87	152,15
Propionat	0,81	74,08
Flurbiprofenat	0,802	243,26
Ibuprofenat	0,79	205,28
Flufenamat	0,75	281,20
Acrylat	0,73	72,06
Monoethylsuberat	0,71	202,25
Acetylsalicylat	0,7	186,16
4-Amino-2-hydroxy-Benzoat	0,68	153,14
Hippurat	0,63	179,98
Anthracen-9-carbonat	0,607	222,24
Monomethylazealat	0,58	202,35
Nikotinat	0,55	123,11
4-tert-Butylbenzoat	0,54	178,23
4-Hydroxybenzoat	0,46	138,12
N-Acetylglucinat	0,44	117,10
Indometacinat	0,41	357,79
Pimelinat	0,32	160,17
Morphin-Base	0,314	285,34
Monoethylsebacat	0,30	230,30
Caprinat	0,27	172,27
Formiat	0,068	46,02

Tab.5: Permeationsrangfolge der untersuchten Morphiniumsalze im U-Rohrmodell (mg/ml)

## **6. Berechnung des Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten der eingesetzten Säuren**

Die Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten wurden mit Hilfe einer Demonstrationsversion des Computerprogramms KowWin<sup>®</sup> der Firma Syracuse Research Corporation berechnet. Das Programm arbeitet nach einer von Meylan und Howard entwickelte Methode. Diese legt bei der Berechnung des Verteilungskoeffizienten einer Verbindung den statistisch ermittelten Einflußfaktor einzelner Molekülfragmente auf den Gesamtverteilungskoeffizienten der Verbindung zugrunde. Korrekturfaktoren berücksichtigen die Position der Fragmente im Molekül<sup>55)</sup>.

Durch die Berechnung des Verteilungskoeffizienten umgeht man mögliche Abweichungen und Meßungenauigkeiten, die bei seiner experimentellen Erfassung auftreten könnten. Da allen Berechnungen die gleiche Methode zugrunde liegt, ist ein direkter Vergleich der ermittelten Werte untereinander möglich. Die Verwendung experimentell ermittelter Werte aus der Literatur, ist problematisch, da diese aus verschiedenen Arbeitskreisen stammen und die experimentellen Bedingungen nicht übereinstimmen. Tabelle 6 enthält die nach abnehmender Lipophilie geordneten Verteilungskoeffizienten sowohl der freien Säuren, aus denen Morphiniumsalze gebildet wurden, als auch deren Natriumsalze. Die Berechnung des Verteilungskoeffizienten der deprotonierten Säure ist unerlässlich, da die Säure im Morphiniumsalz ebenfalls deprotoniert vorliegt und deshalb berücksichtigt werden muß.

org. Carbonsäure	Verteilungs- koeffizient	Natriumssalz	Verteilungs- koeffizient
Flufenaminsäure	5,69	Flufenamat	1,89
Indometacin	5,02	Anthracen-9-carbonat	0,08
Anthraceen-9-carbonsäure	4,23	Flurbiprofenat	0,37
Caprinsäure	4,02	Ibuprofenat	0,35
Flurbiprofen	3,81	Caprinat	0,20
Ibuprofen	3,79	Monoethylsebacat	-0,25
4-tert-Butylbenzoesäure	3,78	Naproxenat	-0,34
Sebacinsäuremonoethylester	3,56	4-Tertbutylbenzoat	-0,36
Naproxen	3,1	Ketoprofenat	-0,44
Sebacinsäuremonomethylester	3,07	Trimethylbenzoat	-0,63
$\alpha$ -Liponsäure	2,83	Monomethylsebacat	-0,75
Ketoprofen	3,0	Liponat	-0,98
4-Phenylbuttersäure	2,78	4-Phenylbutanat	-1,03
Suberinsäuremonoethylester	2,57	Ketorolacat	-1,12
Ketorolac	2,32	Indometacinat	-1,15
3-Phenylpropionsäure	2,29	Monoethylsuberat	-1,24
4-Brombenzoesäure	2,76	Monomethylazealat	-1,24
Azealinsäuremonomethylester	2,57	4-Brombenzoat	-1,38
Trimethylbenzoesäure	2,42	Salicylat	-1,49
Salicylsäure	2,24	Sebacinsäuremono-Na-salz	-1,52
Sebacinsäure	2,19	3-Phenylpropionat	-1,53
Benzoessäure	1,87	2-Methoxybenzoat	-1,86
2-Methoxybenzoesäure	1,61	Phenylacetat	-2,02
Phenylessigsäure	1,43	4-Hydroxybenzoat	-2,10
4-Hydroxybenzoesäure	1,39	Benzoat	-2,27
Phenoxyessigsäure	1,33	Phenoxyacetat	-2,48
Acetylsalicylsäure	1,13	Pimelinsäuremono-Na-salz	-2,51
4-Amino-2-hydroxybenzoesäure	0,98	Acetylsalicylat	-2,67
4-Aminobenzoessäure	0,96	4-Aminobenzoat	-2,73
Nicotinsäure	0,69	Propionat	-3,23
Pimelinsäure (Heptandisäure)	0,72	Hippurat	-3,35
Propionsäure	0,58	Acrylat	-3,37
Hippursäure	0,46	Nicotinat	-3,46
Acrylsäure	0,44	Sebacinsäuredi-Na-salz	-3,56
2-Methyl-3-nitrobenzoesäure	-0,30	2-Methyl-3-Nitrobenzoat	-4,10
Ameisensäure	-0,46	Formiat	-4,27
N-Acetylglycinsäure	-1,02	Pimelinsäuredi-Na-salz	-4,54
		4-Amino-2-hydroxybenzoat	-6,09
		N-Acetylglycinat	-7,66

Tab.6: Berechnete Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten der eingesetzten Säuren und ihrer Natriumsalze

Ein Vergleich zwischen Tabelle 5 und Tabelle 6 zeigt keine Korrelation zwischen den Verteilungskoeffizienten der an der Morphiniumsalzbildung beteiligten Säure und der jeweils permeierten Morphinmenge. Beispielsweise beträgt der Verteilungskoeffizient für 4-Brombenzoesäure, die in der Permeationsrangfolge in Tabelle 5 den ersten Platz belegt,  $\log p = 2,76$  und für die direkt darauf folgende Trimethylbenzoesäure  $\log p = 2,42$ . Mit einem  $\log p$  von 2,57 liegt der Verteilungskoeffizient von Azealinsäuremonomethylester genau zwischen den beiden vorher genannten. In der Permeationsrangfolge belegt das entsprechende Morphiniummonomethylazealat aber nur Platz 28. Selbst bei Unterteilung der Carbonsäuren in Benzoessäurederivate, Alkyldicarbonsäure-derivate, andere Alkyl- und Arylcarbonsäuren, sowie sonstige Carbonsäuren ist innerhalb dieser Gruppen kein gesetzmäßiger Zusammenhang zwischen dem Verteilungskoeffizienten der Säure und dem Permeationsverhalten des entsprechenden Morphiniumsalzes festzustellen. Für die Beeinflussung der permeierenden Morphinmenge bei transdermalen Applikation eines Morphinium-(Carbonsäure)-Salzes müssen also weitere Faktoren berücksichtigt werden.

## **7. Bestimmung der $pK_s$ -Werte der eingesetzten Säuren**

### *7.1 Bestimmung der $pK_s$ -Werte und der Vergleich mit den Permeationseigenschaften der entsprechenden Morphiniumsalze*

Ein weiteres Unterscheidungskriterium zwischen den eingesetzten Carbonsäuren ist der  $pK_s$ -Wert. Es sollte untersucht werden, ob die Acidität einer Carbonsäure die Permeationseigenschaften ihres Morphiniumsalzes beeinflusst. Um den unterschiedlichen Löslichkeitseigenschaften der Säuren gerecht zu werden, wurde ein zu gleichen Teilen aus Wasser und Isopropanol bestehendes Lösungsmittelgemisch verwendet. In diesem Solventgemisch können alle zu bestimmenden Säuren gelöst werden. Unter diesen Bedingungen ist es möglich, die gemessenen  $pK_s$ -Werte miteinander zu vergleichen.

Die Säuren wurden mit einer 0,1N NaOH-Lösung in einer automatischen Titriervorrichtung bestimmt. Der Verlauf der Titration läßt sich potentiometrisch über eine pH-Glaselektrode überwachen.. Nach Überschreiten des Äquivalenzpunktes ist es möglich, die Titration abubrechen, da für die Bestimmung des  $pK_s$ -Wertes der Äquivalenzpunkt der Säure-Base-Titration relevant ist. Zur Ermittlung des  $pK_s$ -Wertes wurde anschließend die Henderson-Hasselbalch-Gleichung herangezogen.

Danach ist  $K_s$  die Geschwindigkeitskonstante der Säuredissoziationsgleichung  $HA \longrightarrow H^+ + A^-$  (1).  $HA$  stellt die protonierte Säure dar.  $H^+$  und  $A^-$  die in Proton und Säureanion dissoziierte Form.

$K_s$  resultiert aus dem Quotienten der Konzentrationen der dissoziierten und der nichtdissoziierten Säure.

$$K_s = [H^+][A^-] / [HA] \quad (2) .$$

Durch Umformen erhält man

$$[H^+] = K_s [HA] / [A^-] \quad (3) .$$

Nach der Henderson-Hasselbalch Gleichung

$$pH = pK_s - \log [HA] / [A^-] \quad (4),$$

entspricht der  $pK_s$  dem pH für den Fall, daß der Ausdruck

$$(\log [HA] / [A^-]) = 0 \quad (5)$$

gleich 0 ist. Dies gilt für die Situation  $[HA] = [A^-]$ . Die Konzentration an protonierter Säure entspricht der des Säureanions, wenn genau die Hälfte der Säure während der Titration neutralisiert wurde. Der  $pK_s$ -Wert der Säure ist demnach gleich dem pH-Wert der Lösung, sobald die Hälfte der Maßlösung verbraucht wurde, die bis zur Titration zum Äquivalenzpunkt nötig ist.

Die ermittelten  $pK_s$ -Werte der Säuren, die zur Bildung der untersuchten Morphiniumsalze verwendet wurden, sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Säure	$pK_s$ -Wert
Salicylsäure	3,93
Phenoxyessigsäure	3,97
Hippursäure	4,10
N-Acetylglycin	4,39
Nicotinsäure	4,54
Ketorolac	4,92
Trimethylbenzoesäure	4,93
4-Brombenzoesäure	5,0
Flufenaminsäure	5,13
4-Phenylbuttersäure	5,4
2-Methoxybenzoesäure	5,52
4-tert-Butylbenzoesäure	5,76
Benzoessäure	5,76
Ketoprofen	5,84
4-Phenylbenzoesäure	5,87
Sebacinsäuremonomethylester	5,97
Sebacinsäuremonoethylester	6,05
4-Hydroxybenzoesäure	6,06
Ibuprofen	6,13
Caprinsäure	6,41
4-Aminobenzoessäure	6,44

Tab. 7:  $pK_s$ -Werte einiger zur Morphiniumsalzbildung verwendeter Säuren.

Die Unterschiede im Permeationsverhalten verschiedener Morphiniumsalze sind nicht durch die Acidität der an der Salzbildung beteiligten Säure bedingt. So hat

Trimethylbenzoesäure, deren Morphiniumsalz bei der Freisetzung aus einem Tylose/Wasser-Vehikel sehr gute Morphinpermeationseigenschaften zeigt, einen  $pK_s$ -Wert von 4,93. Der  $pK_s$ -Wert von Nicotinsäure beträgt nach dieser Meßmethode 4,54. Trotz der ähnlichen  $pK_s$ -Werte permeiert bei Applikation von Morphiniumnicotinat unter gleichen Bedingungen eine wesentlich geringere Menge von Morphin durch das Hautgewebe als beim Morphiniumtrimethylbenzoat.

Die unterschiedlich starke Steigerung der Morphinpermeation durch den Einsatz verschiedener organischer Carbonsäuresalze läßt sich demnach nicht durch die jeweiligen physikochemischen Eigenschaften der verwendeten Säurekomponente erklären. Die Permeationseigenschaften der durch Salzbildung entstandenen Ionenpaare sind also nicht auf den Verteilungskoeffizienten und die  $pK_s$ -Werte der Säurekomponente zurückzuführen. Die Aufrechterhaltung der für die Hautpenetration günstigen physikochemischen Eigenschaften der Ionenpaare läßt auf eine stabile Assoziation schließen. Im folgenden Abschnitt sollte versucht werden, diese stabilen Ionenpaare durch massenspektrometrische Methoden zu detektieren.



## *8. Massenspektrometrische Untersuchungen von Morphiniumsalzen*

### *8.1 Das APCI Ionisierungs- und Probenzuführungsverfahren*

Um zu untersuchen, ob sich stabile Ionenpaare bilden, sollte versucht werden, diese massenspektrometrisch (MS) zu detektieren. Dazu mußte zunächst ein geeignetes Ionisierungsverfahren gefunden werden.

Da nichtkovalente Bindungskräfte schwächer sind als die kovalenter Bindungen, ist die Elektronenstoßionisation (EI) zur Untersuchung nichtkovalenter Assoziate ungeeignet. Hierbei werden sogar kovalente Bindungen gespalten, und es kommt zu Molekülfragmentierungen. Assoziate werden aus diesem Grund bei der Kollision mit beschleunigten Elektronen durch Übertragung hoher Überschußenergie zerstört.

Eine sanftere Ionisierungsmöglichkeit bietet die chemische Ionisierung (CI). Beim CI-Verfahren ionisieren Elektronen zunächst ein Reaktandgas wie z.B. Ammoniak, dessen Plasmaionen die zu untersuchende Substanz über Ionen-Molekül Reaktionen protonieren und so in eine detektierbare Form überführen<sup>56)</sup>. Jedoch konnten durch chemische Ionisierung keine Assoziate nachgewiesen werden. Dies ist zum Teil auch durch die thermische Belastung beim Verdampfen der Probe bedingt.

Mit einer besonders schonenden Methode der Probenzuführung und Ionisierung, der Ionisierung bei Atmosphärendruck (API), wurde ein weiterer Versuch unternommen, die Ionenpaare zu detektieren. Diese Ionisierungsart ist bereits seit längerem bekannt. Sie hat jedoch erst in letzter Zeit als geeignetes Kopplungsverfahren von Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie an Bedeutung gewonnen<sup>57)</sup>. Der Nachweis supramolekularer Proteinkomplexe mittels API-MS gelang bereits 1996 Przybylski<sup>58)</sup>. Es wurde eine Variante der API, die APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) eingesetzt. Hierbei wird eine zum Aerosol versprühte Lösung in ein elektrisches Feld gebracht; dadurch werden Lösungsmittelmoleküle ionisiert, die wiederum analog zur

chemischen Ionisierung das Analysat ionisieren. Abbildung 12 zeigt schematisch den Aufbau einer APCI Ionenquelle.

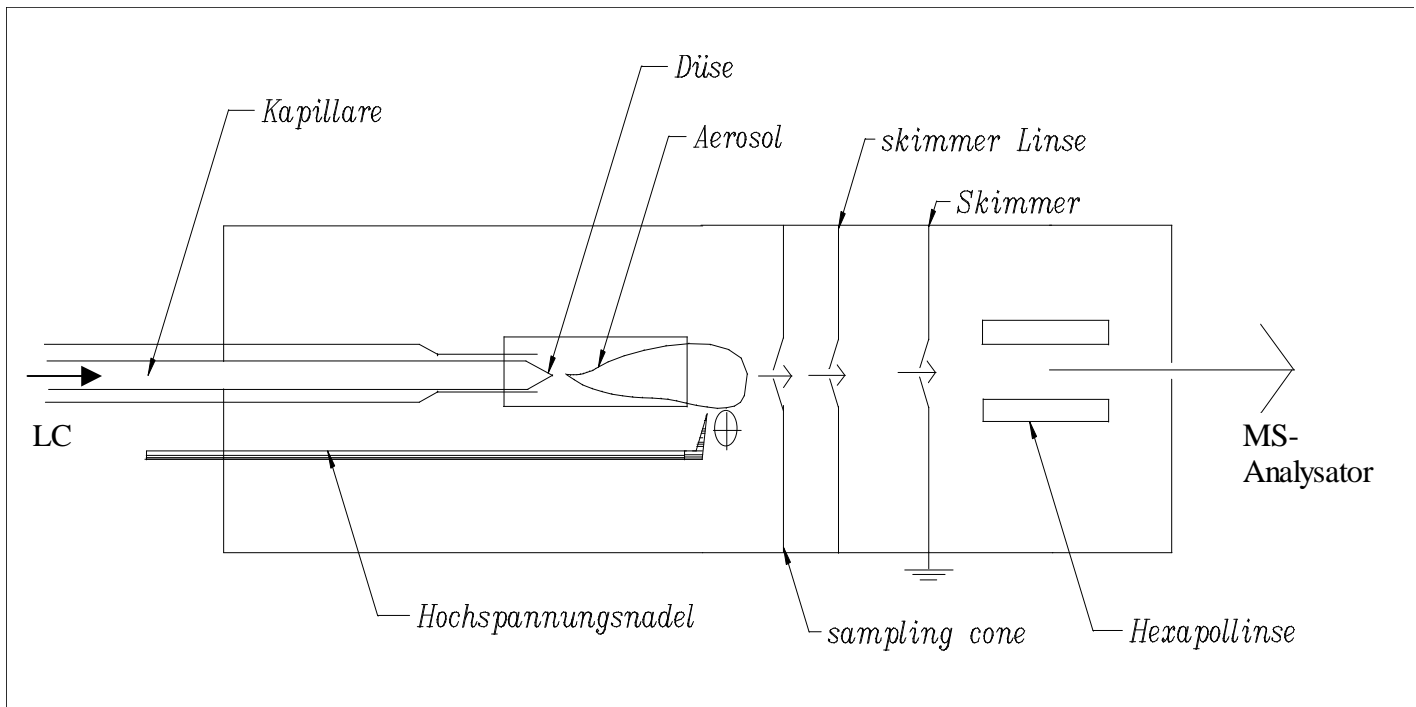
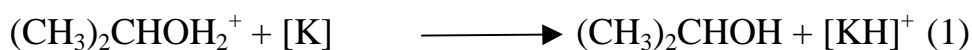


Abb.12: Prinzipieller Aufbau einer APCI-Ionenquelle

Durch eine Kapillare gelangt die Lösung in die Ionenquelle. An der Kapillarspitze wird die Lösung durch Verdampfen und Vernebeln in ein Aerosol überführt. Die hinter der heizbaren Kapillardüse angebrachte Hochspannungsnadel erzeugt ein inhomogenes, elektrisches Feld zwischen der Nadel und der Lochblende (sampling cone), dem Bereich, in dem die Lösungsmittelmoleküle ionisiert werden<sup>59)</sup>.

Bei den durchgeführten Untersuchungen wurde Isopropanol als Lösungsmittel verwendet. Protonierte Isopropanolmoleküle übertragen ihr Proton auf den zu untersuchenden Komplex [K] (1).



Die positiv geladenen Komplexe werden nun im elektrischen Feld beschleunigt und passieren sampling cone, Skimmerlinse und Skimmer. Diese sind als Lochblenden Teile der Ionenoptik, die dazu dient, den Ionenstrahl so zu fokussieren, daß er in optimaler Form und Größe in den Analysator eintritt. Außerdem trennen sie die einzelnen Bereiche von Atmosphärendruck bis zum Hochvakuum beim Übergang ins Massenspektrometer. Die am sampling cone und Skimmerlinse anliegende Spannung ist veränderbar. Ihre Höhe wird in Prozent der Nadelspannung angegeben (Beschleunigungsspannung) und beeinflußt die Fragmentierung und damit das Aussehen der Spektren. Zur Ionenoptik gehört auch eine Hexapollinse. Diese befindet sich zwischen Skimmer und Eintritt in den Analysator. Sie gewährleistet ohne großen Fokussierungsverlust den Weitertransport der Ionen zum Analysator.

Nach Auftrennung in einem doppelt fokussierenden Analysator werden die Ionen mit einem Sekundärelektronenvervielfältiger detektiert.

Vorraussetzung für die Ionisierung durch Protonenübertragung ist eine ausreichende Protonenaffinität der Substanz. Stickstoffhaltige Substanzen wie Morphin besitzen eine Protonenaffinität zwischen 890 und 960 KJ/mol und liegen damit über dem Wert von Isopropanol. Morphin ist daher mittels APCI gut zu ionisieren. Zur Aufnahme der Spektren wurden zunächst jeweils äquimolare Lösungen von Morphin und der entsprechenden Carbonsäure hergestellt. Zum Nachweis der Ionenpaarbildung wurden die Lösungen von Morphin-Base und der entsprechenden Säure zuerst getrennt untersucht, indem jeweils 20 µl über ein Ventil in die Kapillare injiziert wurden. Anschließend wurden die Lösungen vereint und wiederum 20 µl des Gemisches in gleicher Weise untersucht.

Zur Erhöhung der Empfindlichkeit muß die am sampling cone und der Skimmerlinse angelegte Spannung gesteigert werden. Das hat zur Folge, daß

dem Ionenpaar eine höhere Energiemenge zugeführt wird und seine Detektierbarkeit abnimmt. Um einen Kompromiss zwischen Empfindlichkeit und Detektierbarkeit zu finden, kann ein Komplex bekannter Stabilität als Kalibrierstandard herangezogen werden.

## 8.2 Nachweis des Morphinium-2-methoxybenzoat Ionenpaares

Das Massenspektrum von reiner Morphin-Base (Abb.13) zeigt ein deutliches  $[\text{Morphin}+\text{H}]^+$ -Signal bei einer Masse von  $m/z$  286, die dem Molekulargewicht von Morphin, zuzüglich eines Protons entspricht. Das Signal bei  $m/z$  346 resultiert aus der Bildung eines Morphin-Lösungsmitteladduktes. Ebenfalls zu erkennen ist ein Signal bei  $m/z$  571. Dies resultiert aus der Bildung von Morphindimeren  $[2\text{Morphin}+\text{H}]^+$ .

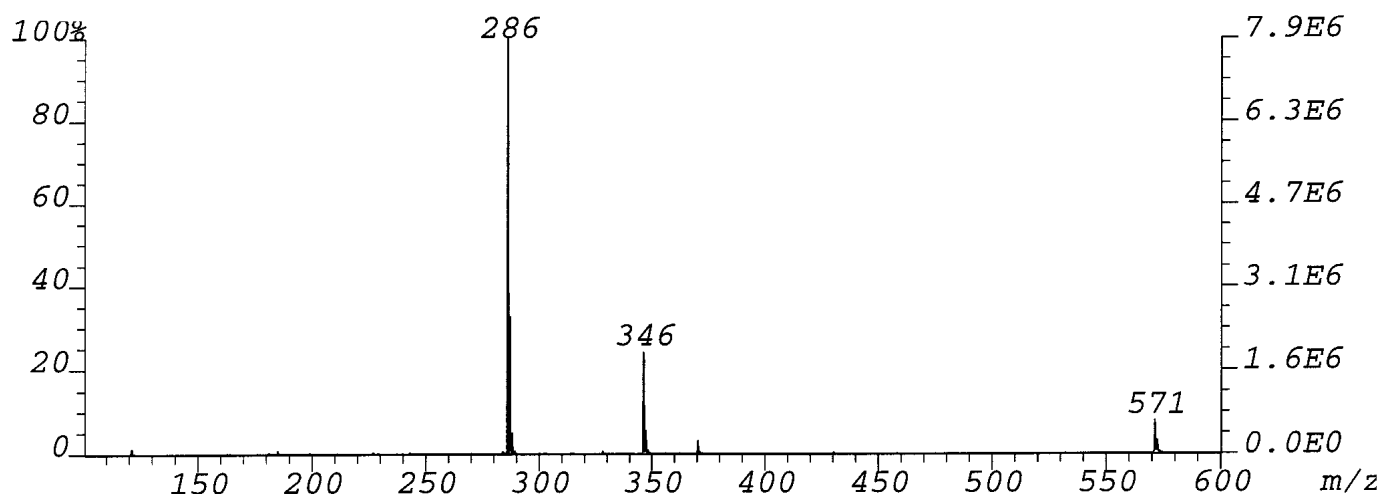


Abb.13: APCI-Massenspektrum von Morphin-Base; Isopropanol; C/S=10%/15%

Für die 2-Methoxybenzoesäure erhält man unter identischen Bedingungen das in Abb.14 wiedergegebene Massenspektrum.

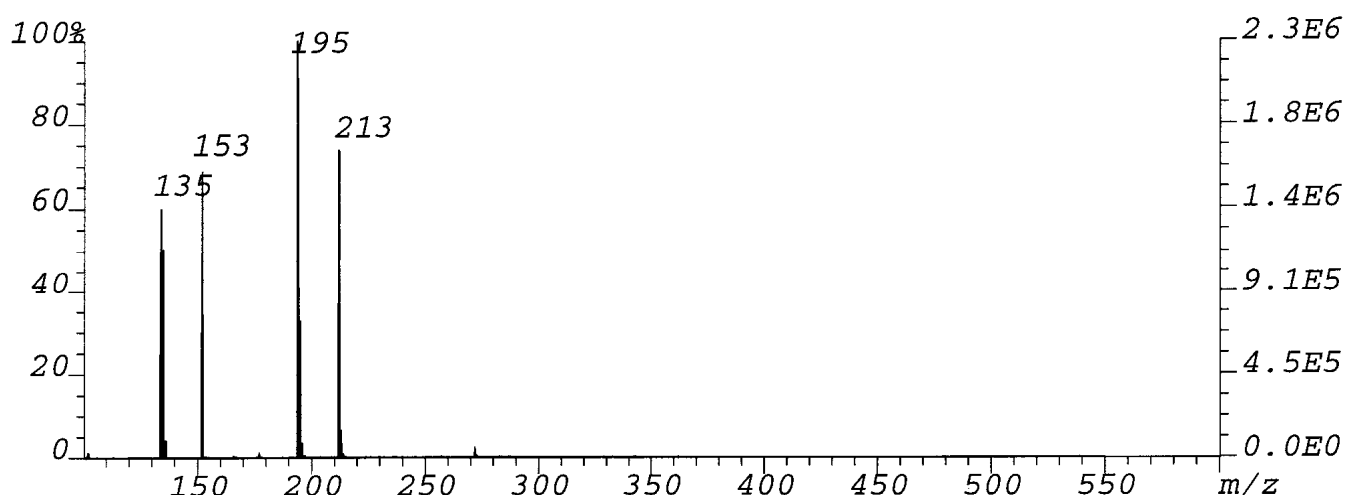


Abb.14: APCI-Massenspektrum der 2-Methoxybenzoesäure; Isopropanol; C/S= 10%/15%

Sowohl der  $[M+H]^+$  Peak der 2-Methoxybenzoesäure bei  $m/z$  153, als auch der des Isopropanoladduktes bei  $m/z$  213 sind neben einem nicht zuordnungsbarem Signal bei  $m/z$  195 zu erkennen.

Nach Vereinigung der beiden Lösungen wurde unter identischen Bedingungen das in Abbildung 15 gezeigte Massenspektrum registriert.

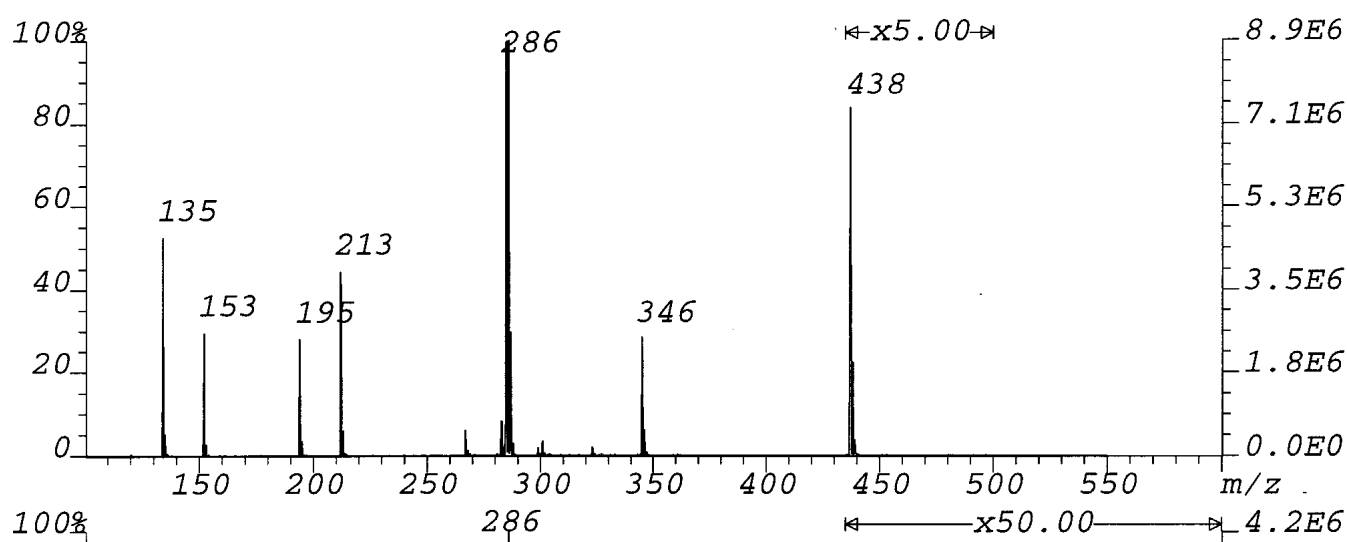


Abb.15: APCI-Massenspektrum von Morphinium-2-methoxybenzoat; Isopropanol; C/S= 10%/15%

Bei einer Sampling Cone/Skimmerlinse Spannungsverhältnis von 10%/15% ist neben dem Morphin  $[Morphin+H]^+$  Signal bei  $m/z$  286 deutlich der

$[\text{Morphin}+\text{Säure}+\text{H}]^+$  Peak des Ionenpaares bei  $m/z$  438 zu erkennen. Dies ist nach Erhöhung der C/S Spannung nicht mehr möglich. Das Signal bei  $m/z$  346 wird durch ein Morphin-Isopropanol-Assoziat hervorgerufen. Das bei einer C/S-Spannung von 6%/6% registrierte Massenspektrum in Abbildung 16 zeigt bei 50-facher Verstärkung neben dem  $[\text{Morphin}+\text{Säure}+\text{H}]^+$ -Ionenpaar bei  $m/z$  438 das  $[\text{2Morphin}+\text{H}]^+$ -Dimer bei  $m/z$  571. Weitere Signale sind der  $[\text{Morphin}+\text{H}]^+$ -Peak bei  $m/z$  286 und der Peak des  $[\text{Morphin}+\text{Isopropanol}+\text{H}]^+$ -Assoziats. Nur wenige Fragmentierungssignale im Bereich von  $m/z$  135 bis 220 sind bei dieser geringen C/S-Spannung zu detektieren.

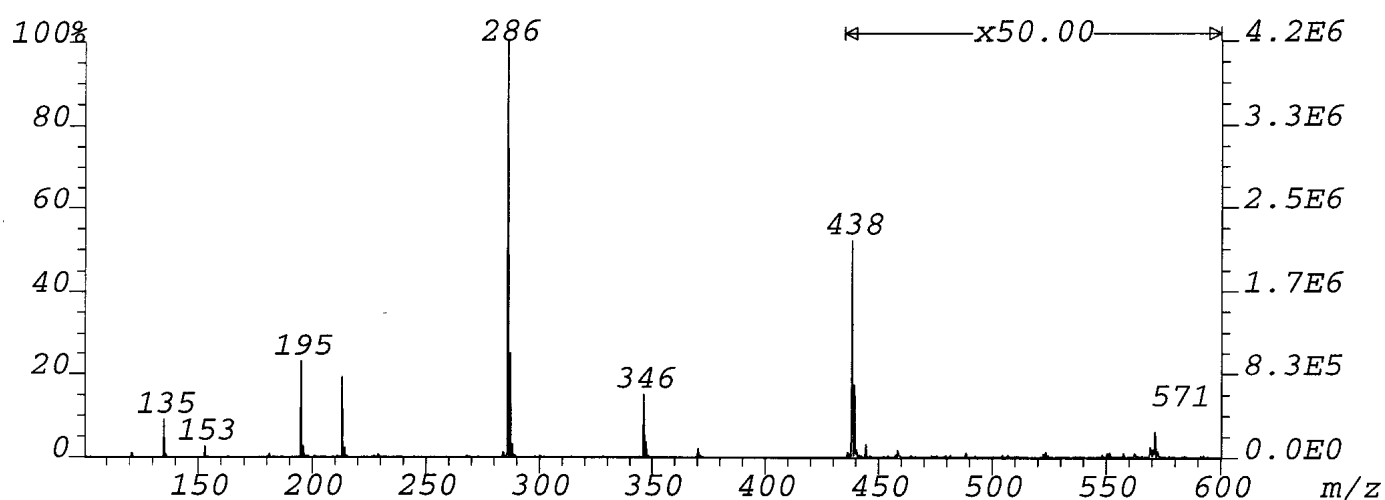


Abb. 16: APCI-Massenspektrum von Morphinium-2-methoxybenzoat; Isopropanol; C/S= 6%/6%

Die Abbildungen 17 bis 20 zeigen die Massenspektren des Morphinium-2-methoxybenzoats bei Erhöhung der zugeführten Energiemenge durch Steigerung der C/S-Spannung.

Wie aus Abbildung 17 ersichtlich, steigt bereits bei einer C/S-Spannung von 15%/15% die Intensität der Signale im Bereich von  $m/z$  135 bis  $m/z$  270 an, was auf eine verstärkte Fragmentierung hindeutet. Das  $[\text{Morphin}+\text{H}]^+$ -Signal ( $m/z$  286), das  $[\text{Morphin}+\text{Isopropanol}+\text{H}]^+$ -Signal ( $m/z$  346) und das  $[\text{Morphin}+\text{Säure}+\text{H}]^+$ -Signal des Ionenpaares ( $m/z$  438) sind ohne Verstärkung noch gut zu erkennen.

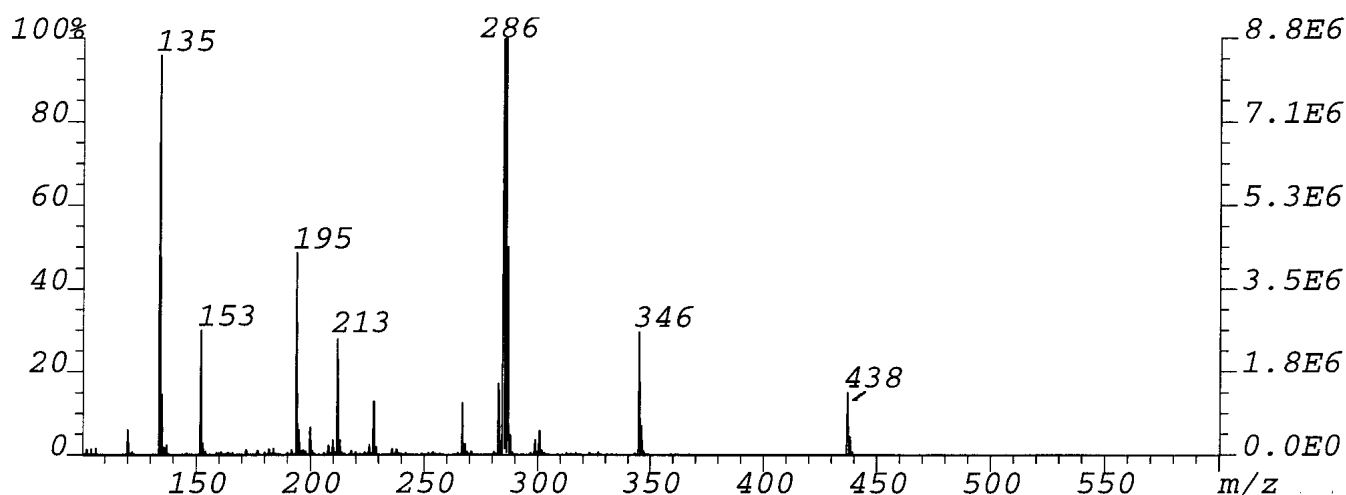


Abb.17: APCI-Massenspektrum von Morphinium-2-methoxybenzoat;  
Isopropanol; C/S= 15%/15%

Das nach einer Erhöhung der C/S-Spannung auf 20%/20% registrierte Massenspektrum der Abbildung 18 zeigt eine deutliche Abnahme der Intensität des  $[\text{Morphin}+\text{Säure}+\text{H}]^+$ -Signals. Erhöht hat sich die Anzahl der Signale im Bereich von m/z 130 bis m/z 270. Weiterhin erkennbar sind das  $[\text{Morphin}+\text{H}]^+$ -Signal (m/z 286), und das  $[\text{Morphin}+\text{Isopropanol}+\text{H}]^+$ -Signal bei (m/z 346)

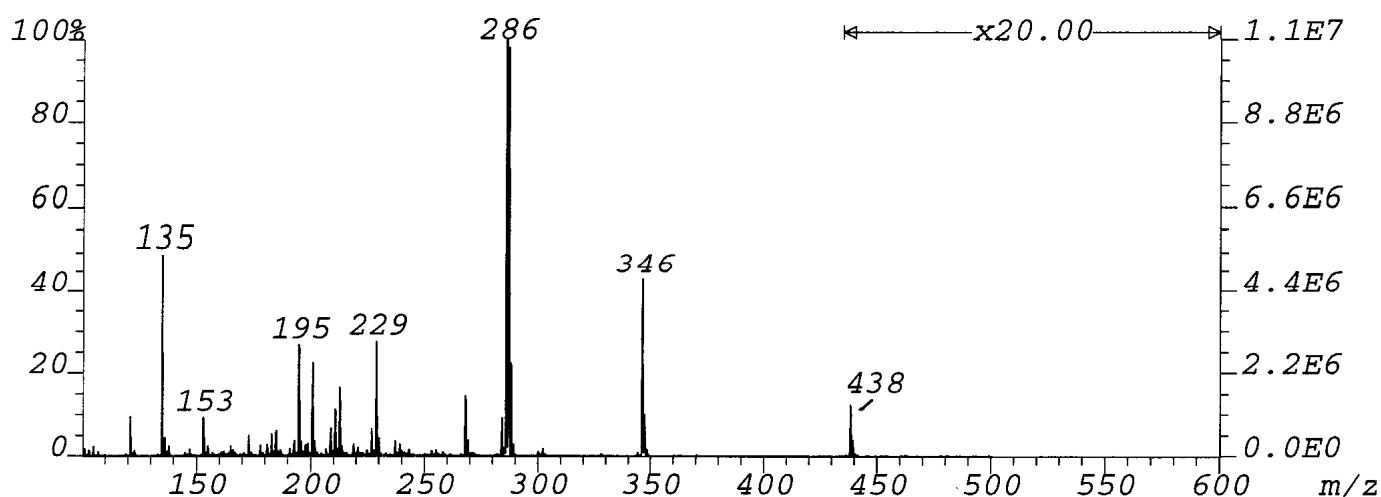


Abb.18: APCI-Massenspektrum von Morphinium-2-methoxybenzoat;  
Isopropanol; C/S= 20%/20%



Dieser Prozeß setzt sich fort, nachdem die C/S-Spannung weiter auf 30%/30% erhöht wird. Wie der Abbildung 19 zu entnehmen ist, steigt wiederum die Zahl der Fragmentierungssignale im niedermolekularen Bereich des Spektrums, wohingegen die Signalintensität des  $[\text{Morphin}+\text{Isopropanol}+\text{H}]^+$  und des  $[\text{Morphin}+\text{Säure}+\text{H}]^+$ -Signals abnimmt.

Diese Entwicklung ist die Folge aus der Steigerung der zugeführten Energiemenge und die daraus resultierende energetische Belastung des Morphinium-2-methoxybenzoats.

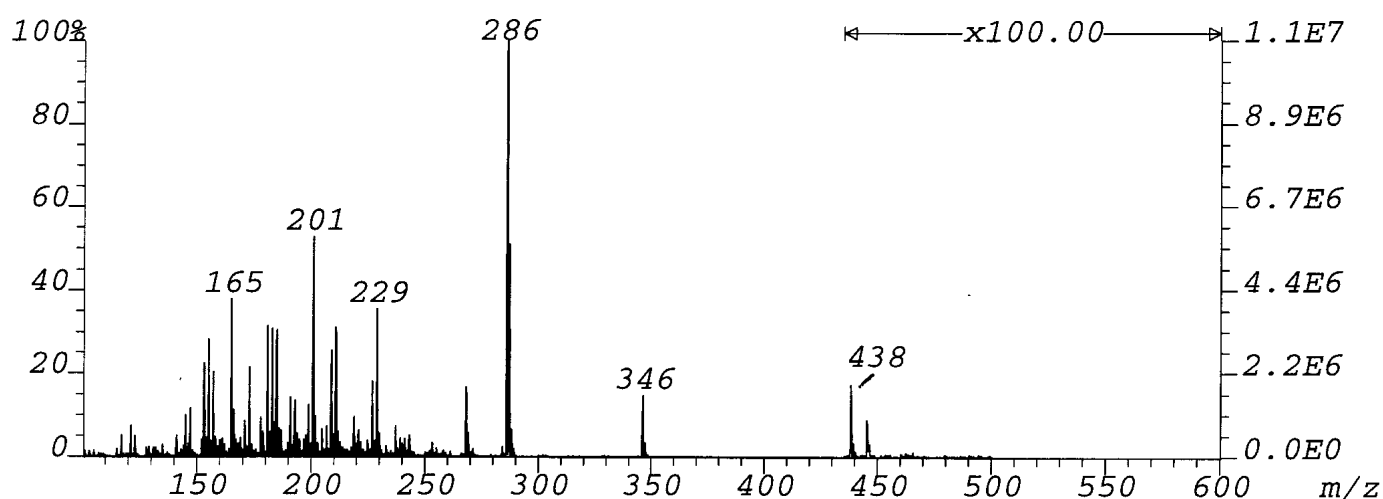


Abb.19: APCI-Massenspektrum von Morphinium-2-methoxybenzoat;  
Isopropanol; C/S= 30%/30%

Eine weitere Erhöhung der C/S-Spannung auf 40%/40% hat zur Folge, daß das Ionenpaar nicht mehr sicher nachweisbar ist. Abbildung 20 zeigt das entsprechende Massenspektrum. Die Intensität der Fragmentierungssignale hat deutlich zugenommen, die des  $[\text{Morphin}+\text{H}]^+$ -Peak bei  $m/z$  286 und des  $[\text{Morphin}+\text{Isopropanol}+\text{H}]^+$ -Peaks abgenommen. Selbst bei der 200-fachen Verstärkung ist das  $[\text{Morphin}+\text{Säure}+\text{H}]^+$ Signal des Morphinium-2-methoxybenzoats kaum auszumachen.

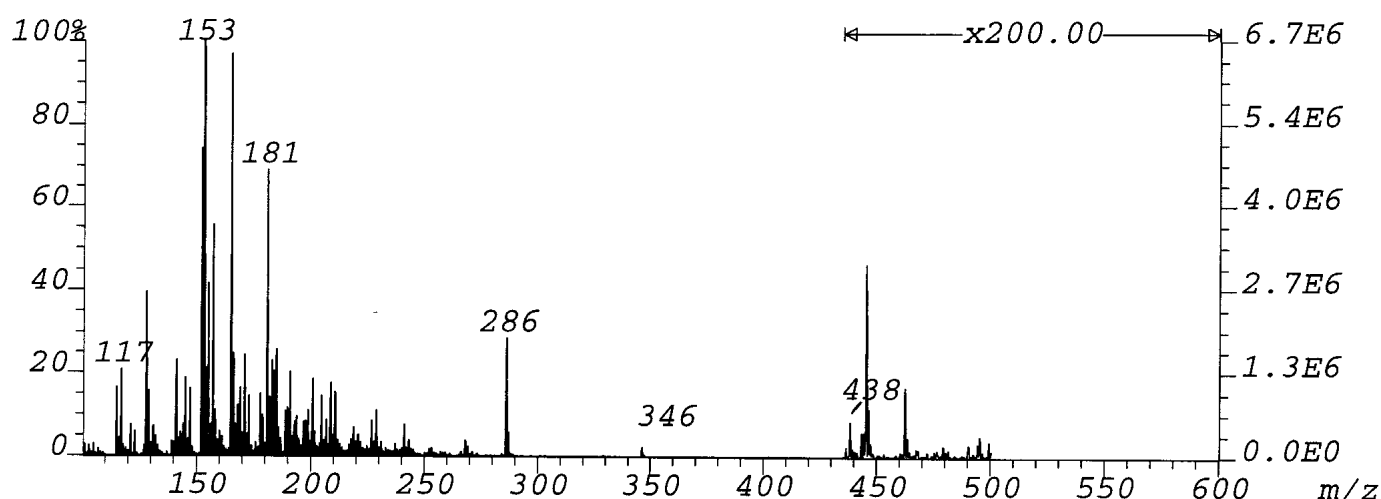


Abb.20: APCI-Massenspektrum von Morphinium-2-methoxybenzoat;  
Isopropanol; C/S= 40%/40%

Es kommt also zur Ausbildung stabiler Ionenpaarkomplexe. Aussagen zum quantitativen Verhältnis zwischen der Ionenpaar- und der Basenkonzentration sind jedoch nicht zuverlässig, da das Vorhandensein bzw. die Intensität eines Signales in der APCI zum einen von der Existenz des Komplexes und seiner Stabilität, zum anderen aber auch von seiner Ionisierbarkeit, d.h. in diesem Fall von seiner Protonenaffinität, abhängt. So erzeugen beispielsweise die verwendeten Säuren bei Messungen in Isopropanol als Lösungsmittel und Transportmedium aufgrund ihrer geringen Protonenaffinität im Gegensatz zur Morphin-Base keine Signale oder nur Signale mit geringer Intensität. Im Gegensatz zur 2-Methoxybenzoesäure erhält man für die Säurekomponenten der folgenden Morphiniumsalze keine  $[\text{Säure}+\text{H}]^+$  Signale im Massenspektrum. Jedoch sind die jeweiligen Ionenpaare wiederum nachweisbar. So läßt sich aus der mangelnden Detektierbarkeit bzw. der geringen Signalintensität des Ionenpaares nicht dessen Vorhandensein ausschließen oder auf ein nur geringes Konzentrationsverhältnis zwischen den Einzelkomponenten und dem Ionenpaar schließen. Nur die innerhalb einer Meßreihe festgestellten, relativen

Intensitätsveränderung eines Signals, z.B. des Ionenpaarsignals durch die Erhöhung der C/S-Spannung, sind zur Beschreibung von Veränderungen des Ionenpaarverhaltens geeignet.

### 8.3 Nachweis des Morphiniumtrimethylbenzoat-Ionenpaares

Während die Trimethylbenzoesäure selber mit der angewandten Ionisierungsmethode nicht detektierbar ist, ist das Ionenpaar im Massenspektrum gut erkennbar. Die Trimethylbenzoesäure (164 g/mol) bildet mit der Morphin-Base ein Ionenpaar  $[\text{Morphin}+\text{Säure}+\text{H}]^+$ , das im Massenspektrum der Abbildung 21 bei 20%/20% C/S Spannung unter 100-facher Verstärkung einen deutlich sichtbaren  $[\text{Morphin}+\text{Säure}+\text{H}]^+$  Peak bei  $m/z$  450 erzeugt. Neben dem ebenfalls gut zu erkennenden Morphin-Base Signal  $[\text{Morphin}+\text{H}]^+$  bei  $m/z$  286 ist weiterhin das Morphin-Base-Isopropanol Addukt bei  $m/z$  346 vertreten. Im Molekulargewichtsbereich von 140 bis 270 g/mol sind neben zwei Signalen größerer Intensität bei  $m/z$  201 und 229 nur wenige schwache Fragmentierungssignale zu sehen.

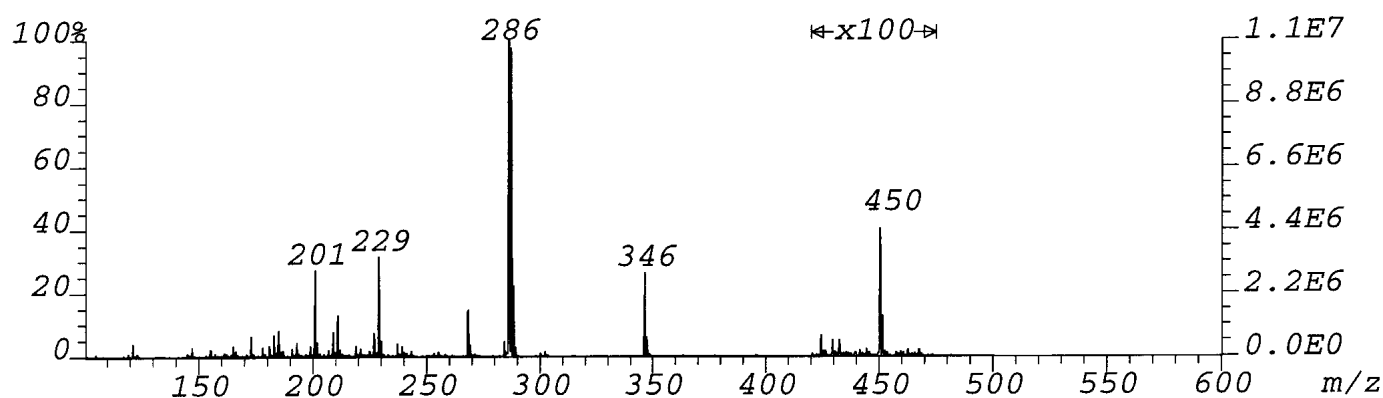


Abb.21: APCI-Massenspektrum von Morphinium-2,4,6-trimethylbenzoat; Isopropanol; C/S= 20%/20%

Die folgende Meßreihe, in der schrittweise die C/S Spannung um jeweils 10% erhöht wurde, zeigt die Abnahme der Ionenpaarintensität durch Erhöhung der zugeführten Energiemenge

Abbildung 22 zeigt, daß das Ionenpaar bei einer C/S Spannung von 30%/30% trotz abnehmender Signalintensität noch gut detektierbar ist. Aus der verstärkten Energiezufuhr resultiert jedoch eine Abnahme der Signalintensität des  $[\text{Morphin}+\text{Säure}+\text{H}]^+$ -Peaks sowie eine Zunahme der Fragmentierungssignale im niedermolekularen Bereich. Außerdem gut erkennbar ist das Morphin-Base Isopropanol Addukt bei  $m/z$  346.

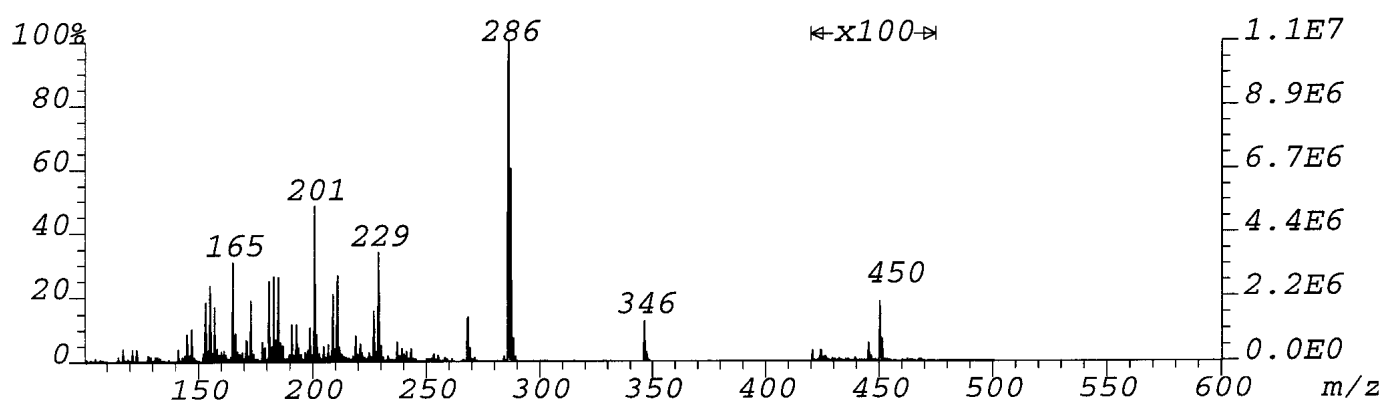


Abb.22: APCI-Massenspektrum 2 von Morphinium-2,4,6-trimethylbenzoat Isopropanol; C/S= 30%/30%

Eine weitere Erhöhung der C/S-Spannung auf 40%/40% (Abb.23) führt zu einer stärkeren Abnahme der Signalintensität des  $[\text{Morphin}+\text{Säure}+\text{H}]^+$ -Signals bei  $m/z$  450 und des  $[\text{Morphin-Base}+\text{H}]^+$ -Signals bei  $m/z$  286. Der  $[\text{Morphin}+\text{Isopropanol}+\text{H}]^+$ -Peak ist kaum mehr sichtbar. Zugenommen hat hingegen die Zahl und Intensität der Fragmentierungssignale unterhalb von  $m/z$  270.

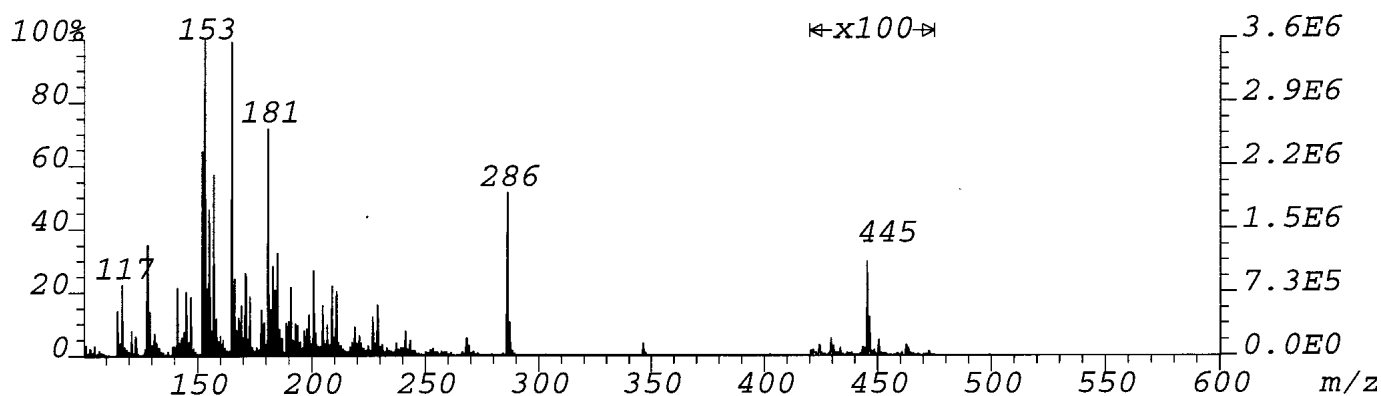


Abb.23: APCI-Massenspektrum von Morphinium-2,4,6-trimethylbenzoat  
Isopropanol; C/S= 40%/40%

Nach weiterer Erhöhung der C/S-Spannung auf 50%/50% ist das Ionenpaar nicht mehr vorhanden. Die zu dessen Zerfall führende und dafür benötigte Energie ist also mit der des Morphinium-2-methoxybenzoats vergleichbar, da beide bei dieser C/S-Spannung nicht mehr sicher nachweisbar sind.

#### 8.4 Nachweis des Morphiniumphenoxyacetat-Ionenpaares

Die Phenoxyessigsäure ist, wie die Trimethylbenzoesäure, durch Ionisierung nach dem APCI-Verfahren nicht detektierbar. Das nach Zugabe von Morphin aufgenommene Massenspektrum (Abb.24) zeigt jedoch das  $[\text{Morphin}+\text{Säure}+\text{H}]^+$  Ionenpaar bei  $m/z$  438 bei einer C/S Spannung von 6%/6%.

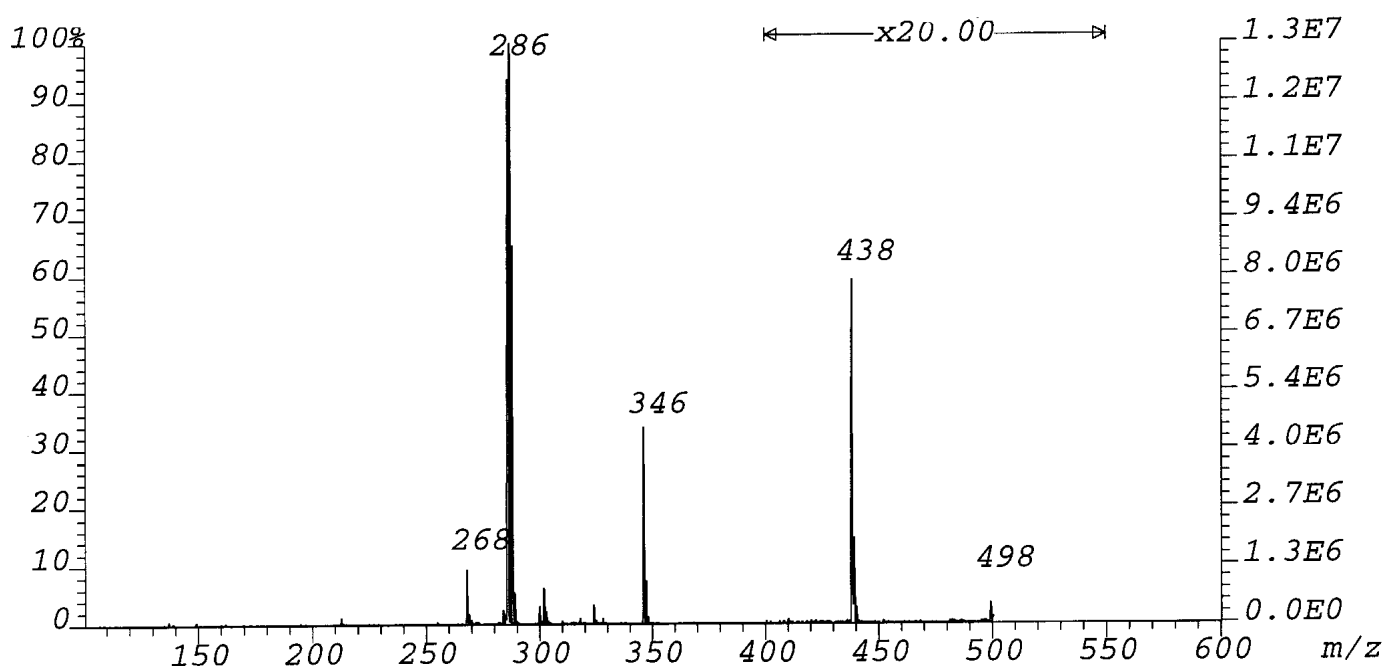


Abb.24: APCI-Massenspektrum von Morphiniumphenoxyacetat; Isopropanol;  
C/S=6%/6%

Ebenfalls gut erkennbar ist wieder das  $[\text{Morphin}+\text{H}]^+$ -Signal bei  $m/z$  286 und das  $[\text{Morphin}+\text{Isopropanol}+\text{H}]^+$ -Signal des Morphin-Lösungsmitteladduktes bei einer Masse von 346 g/mol. Weiterhin erkennbar ist ein Morphiniumsalz-Ionenpaar-Isopropanoladdukt bei  $m/z$  498. Außer einem Signal bei  $m/z$  268, das nicht zugeordnet werden konnte, sind keine weiteren Peaks vorhanden.

Wiederum zeigt eine Erhöhung der C/S-Spannung auf zunächst 20%/20% (Abb.25) eine Zunahme von Fragmentierungssignalen im Bereich von  $m/z$  150 bis 270 g/mol

und eine Abnahme der Signalintensitäten des  $[\text{Morphin}+\text{Isopropanol}+\text{H}]^+$  ( $m/z$  346) bzw. des  $[\text{Morphin}+\text{Säure}+\text{H}]^+$  Peaks ( $m/z$  438).

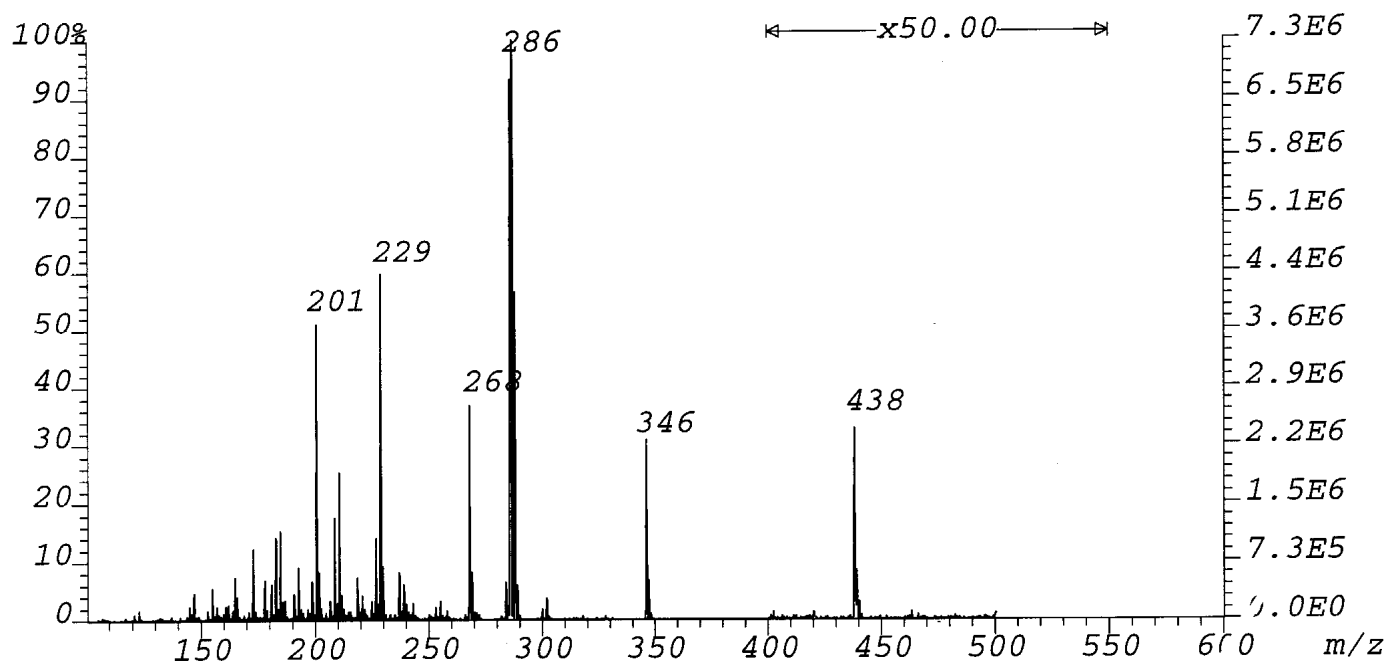


Abb.25: APCI-Massenspektrum von Morphiniumphenoxyacetat; Isopropanol;  
C/S= 20%/20%

Aus Abbildung 26 wird ersichtlich, daß bei einer C/S Spannung von 40%/40% die Zerfallsenergie des Komplexes erreicht ist. Wieder ist eine Abnahme der Intensität des  $[\text{Morphin}+\text{Säure}+\text{H}]^+$ -Peaks und das Erscheinen zusätzlicher Signale im Bereich der Molmassen von 100 bis 270 g/mol zu beobachten. Die Intensität der Fragmentierungssignale hat im Vergleich zum Massenspektrum in Abbildung 25 deutlich zugenommen. Das Vorhandensein des Ionenpaares bei bereits einsetzender Molekülfragmentierung deutet auf eine hohe Stabilität des Morphiniumphenoxyacetat-Ionenpaares hin.



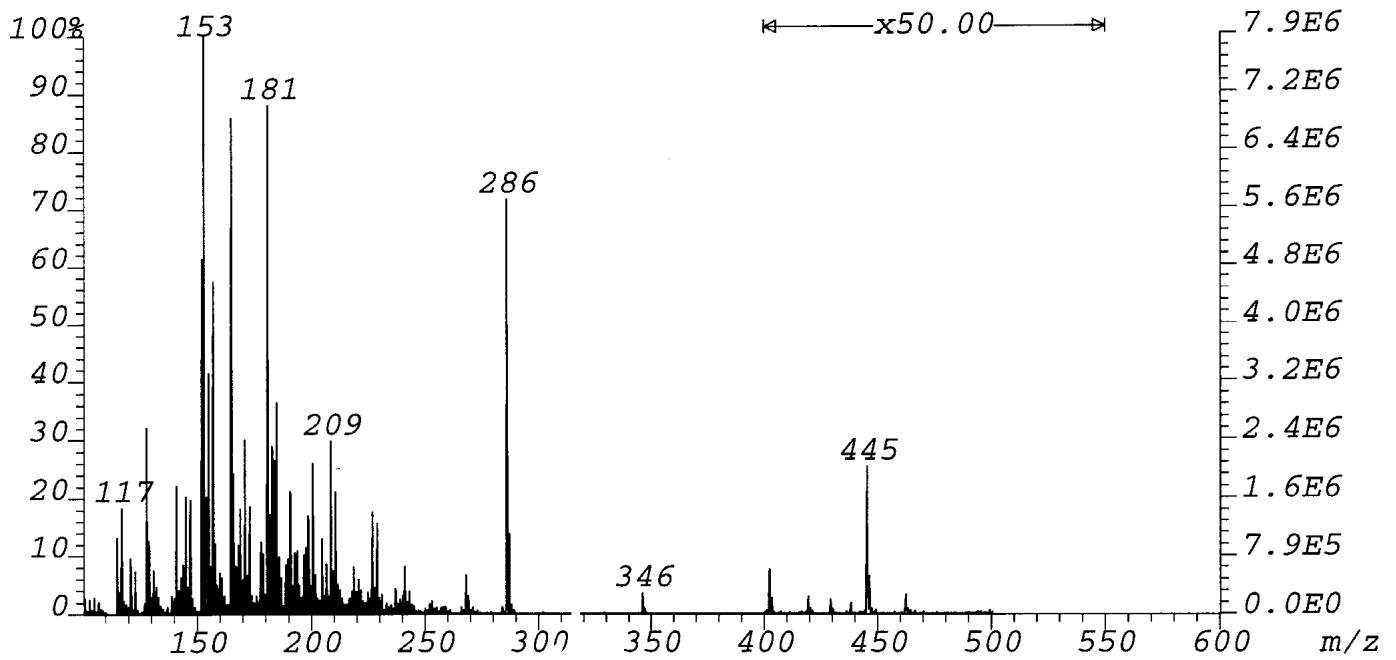


Abb.26: APCI-Massenspektrum von Morphiniumphenoxyacetat; Isopropanol;  
C/S= 40%/40%

### 8.5 Nachweis des Morphiniummonomethylsebacat Ionenpaares

Das Massenspektrum in Abbildung 27, das bei einer C/S-Spannung von 6%/6% aufgenommen wurde, zeigt den  $[\text{Säure}+\text{H}]^+$ -Peak des Sebacinsäuremonomethylesters bei  $m/z$  217.

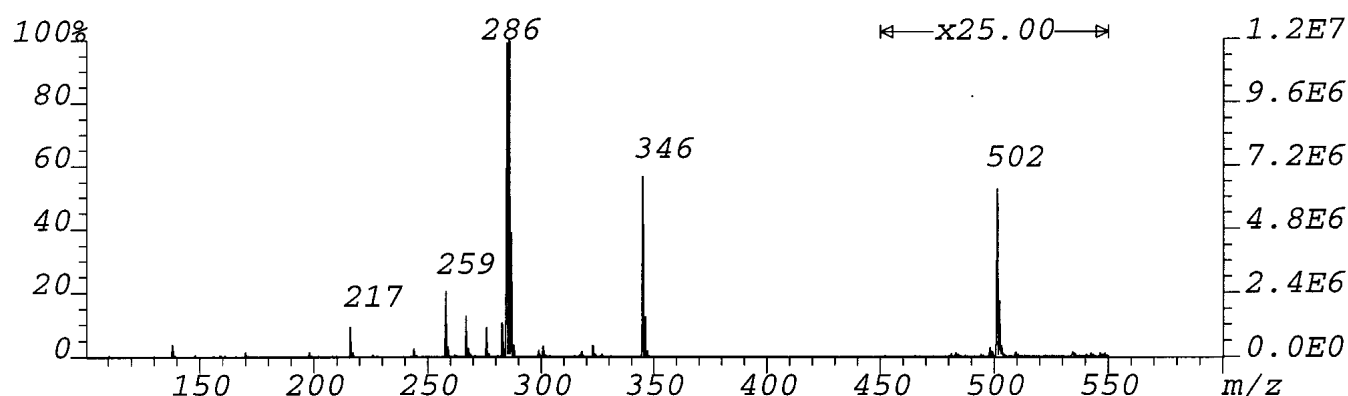


Abb.27: APCI-Massenspektrum von Morphiniummonomethylsebacat;  
Isopropanol; C/S= 6%/6%

Durch die Estergruppe des Dicarbonsäuremoleküls besitzt der Sebacinsäuremonomethylester offensichtlich eine ausreichende Protonen-affinität, um unter den vorhandenen APCI-Bedingungen ionisiert zu werden. Neben diesem Signal sind, wie bei den Messungen zuvor, deutlich das  $[\text{Morphin}+\text{H}]^+$ -Signal der Morphin-Base bei  $m/z$  286 und das  $[\text{Morphin}+\text{Isopropanol}+\text{H}]^+$ -Signal ihres Isopropanoladduktes bei  $m/z$  346 zu erkennen. Das  $[\text{Morphin}+\text{Säure}+\text{H}]^+$ -Signal des Morphiniummono-methylsebacats erscheint bei der  $m/z$  502 unter 25-facher Verstärkung.

Die Erhöhung der C/S-Spannung auf C/S=20%/20% hat wiederum zur Folge, daß vermehrt niedermolekulare Fragmente mit den Massen zwischen  $m/z$  100 und 250 entstehen. Das Ionenpaar ist unter diesen Umständen nicht mehr stabil und so auch nicht mehr nachweisbar (Abb.28).

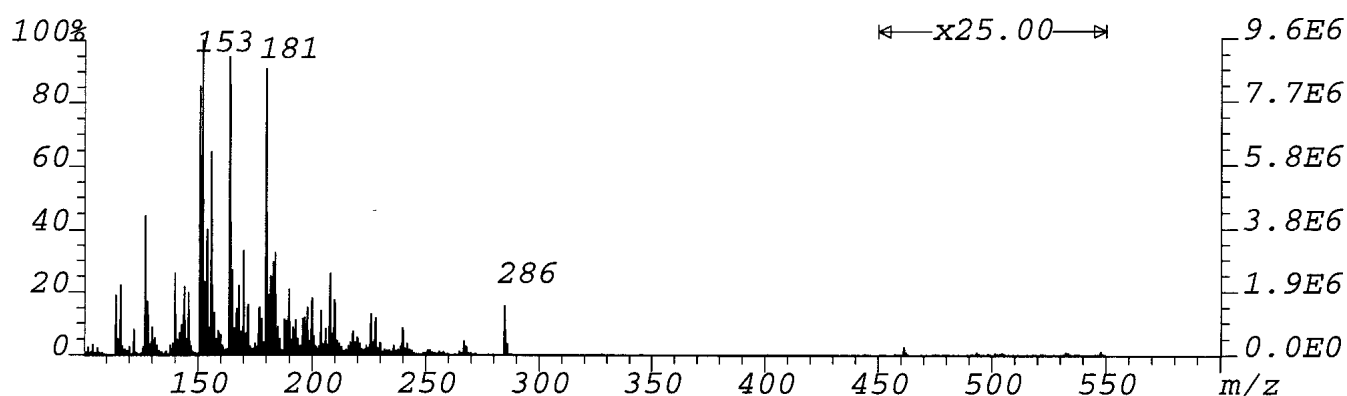
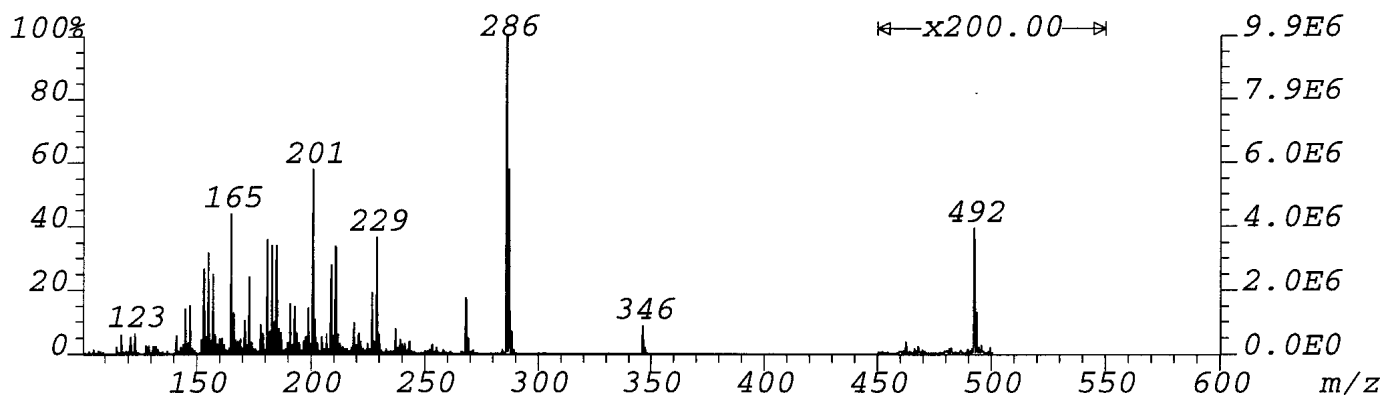
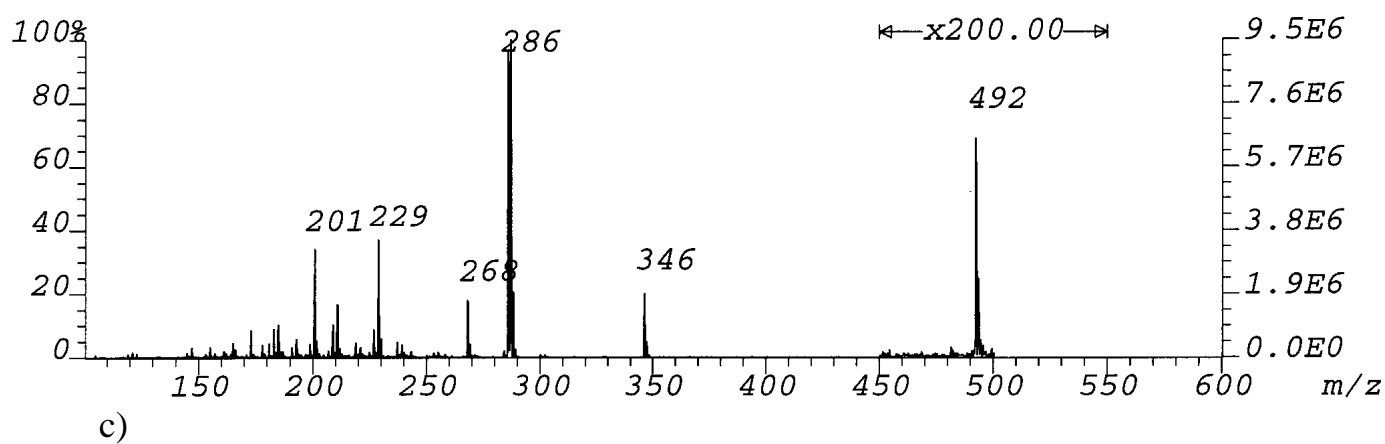
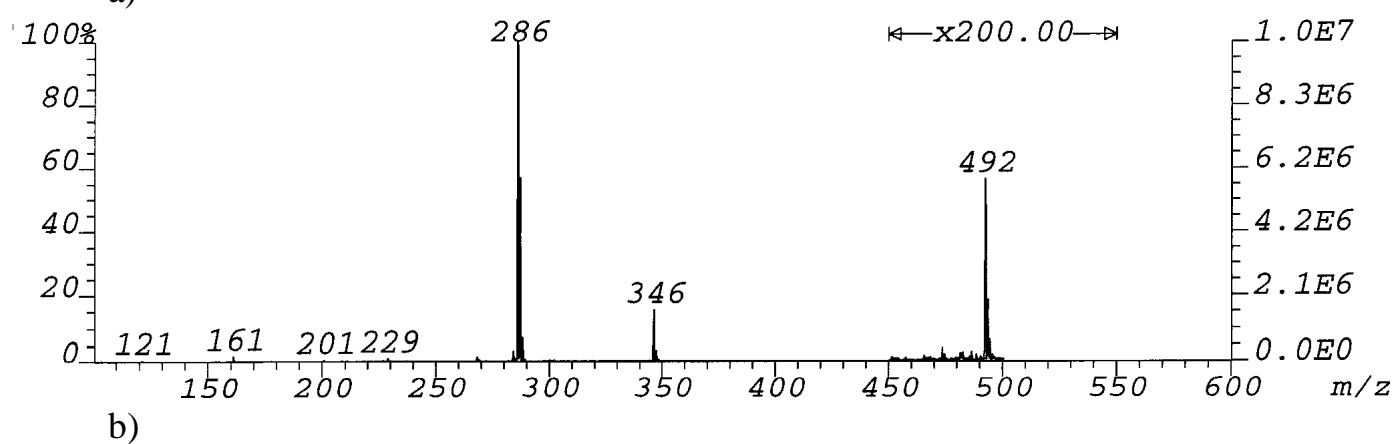
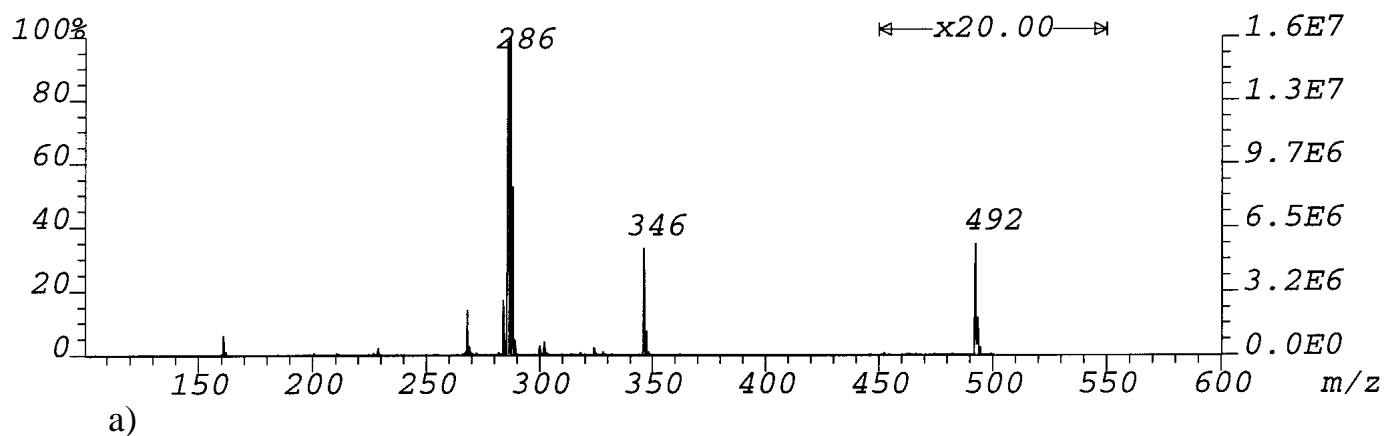


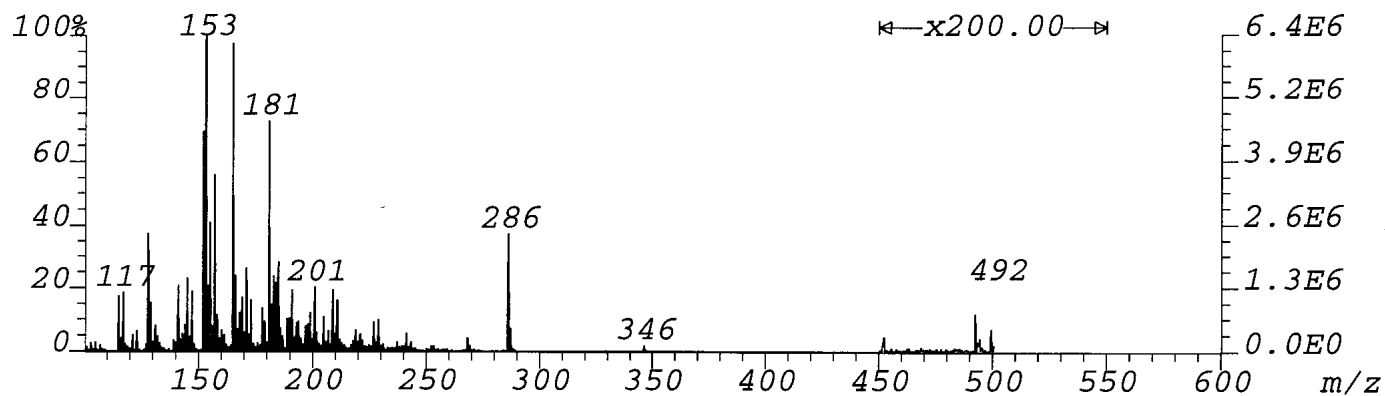
Abb.28: APCI-Massenspektrum von Morphiniummonomethylsebacat;  
Isopropanol; C/S= 20%/20%

### 8.6 Nachweis des Morphiniumibuprofenat-Ionenpaares

Die in Abbildung 29 zusammengefaßten Massenspektren 29a) bis 29e) zeigen das Morphiniumibuprofenationenpaar bei verschiedenen C/S-Spannungen. Bei einer C/S-Spannung von 6%/6% (Abb. 29a) ist das Ionenpaar bei  $m/z$  492 mit 20-facher Verstärkung gut zu erkennen. Weiterhin detektierbar sind das Morphin-Isopropanol-Addukt bei  $m/z$  346 sowie die Morphin-Base ( $m/z$  286). Nach Erhöhung der Spannung auf 10%/10% (Abb. 29b) sind sowohl die Intensitäten des Morphin-Isopropanol-Adduktes, als auch die des Morphiniumibuprofenationenpaares gesunken, so daß letzteres nur mit Hilfe 200-facher Verstärkung des Signals erfaßt werden kann. Trotz weiterer Steigerung der C/S-Spannung auf 20%/20% (Abb. 29c) bleibt die Intensität des Morphiniumibuprofenationenpaares nahezu unverändert. Unterhalb des Bereichs  $m/z$  270 haben sich aufgrund der Erhöhung der zugeführten Energiemenge bereits Molekülfragmente gebildet. Eine erneute Erhöhung der C/S-Spannung auf 30%/30% (Abb. 29d), führt zu einer Verstärkung dieses Effektes. Der  $[\text{Morphin} + \text{Isopropanol} + \text{H}]^+$ -Peak hat nur noch eine geringe Intensität, die Fragmentierungssignale haben in Zahl und Intensität zugenommen. Die abschließende Messung bei C/S=40%/40% zeigt im Massenspektrum (Abbildung 29e), daß das Morphiniumibuprofenationenpaar selbst bei 200-facher Verstärkung nicht mehr sicher nachweisbar ist. Das Signal der Morphin-Base bei  $m/z$  286 wird in der Intensität von den Fragmentierungssignalen im Bereich von  $m/z$  100 bis 270 übertroffen. Wie anhand der vorherigen Beispiele bereits gezeigt, hält das Ionenpaar auch in diesem Fall den zugeführten Energiemengen nicht stand.



d)



e)

Abb.29: APCI-Massenspektrum von Morphiniumibuprofenat; Isopropanol;  
C/S = a: 6%/6%; b: 10%/10%; c: 20%/20%; d: 30%/30%; e:  
40%/40%

Im folgenden Kapitel sollte versucht werden, die Bindungsstärke, bzw den Assoziierungsgrad der Morphiniumsalz-Ionenpaarkomplexe mit Dampfdruck-osmometrie zu quantifizieren.

## 9. Dampfdruckosmotrische Untersuchungen der Morphiniumsalz-Ionenpaare

### 9.1 Dampfdruckosmotrische Untersuchungen von Morphiniumbenzoatlösungen ansteigender Konzentrationen

Bei Dampfdruck und osmotischem Druck handelt es sich bei konstanter Temperatur um rein kolligative Eigenschaften, die unabhängig von der Teilchenart sind.

Nach dem Raoult'schen Gesetz (1) sinkt der Dampfdruck der Lösung direkt proportional mit der Erhöhung der gelösten Teilchenzahl.

Raoult'sches Gesetz:  $\Delta p/p = -n_1/n_0$  (1)

$\Delta p/p$  = Dampfdruckerniedrigung

$n_1$ : Stoffmenge des gelösten Stoffes in Mol

$n_0$ : Stoffmenge des Lösungsmittels in Mol

Gleichzeitig steigt der osmotische Druck, wie in Gleichung (2) beschrieben.

Osmotischer Druck  $P_{Os}$ :  $P_{Os} = n \cdot R \cdot T/V$  (2)

$n$ : Stoffmenge des gelösten Stoffes in Mol

$R$ : allgemeine Gaskonstante 8,3414 J/K x mol

$T$ : absolute Temperatur in Kelvin [K]

$V$ : Volumen der Lösung [m<sup>3</sup>]

Da es bei einer Komplexierung bzw. Assoziierung in Lösung befindlicher Teilchen zur Abnahme der Anzahl osmotisch wirksamer Teilchen kommt, sinkt auch der osmotische Druck.. Dies kann mit einem Dampfdruckosmometer erfaßt werden. Abbildung 30 zeigt den prinzipiellen Aufbau der Meßvorrichtung.

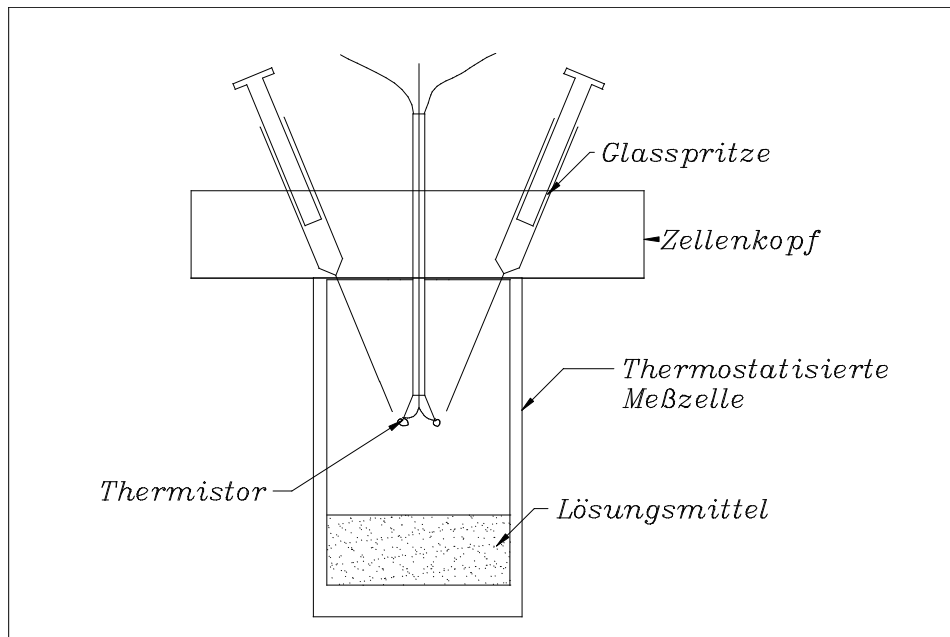


Abb. 30: Prinzipieller Aufbau einer Dampfdruckosmometermeßzelle

In einer elektronisch auf  $10^{-3}^{\circ}\text{C}$  thermostatisierbaren Meßzelle befindet sich ein Becherglas. Der Boden des Glases wird zur Sättigung der Zelle mit Lösungsmitteldampf ca. 1,5 cm hoch mit Lösungsmittel bedeckt. Im ebenfalls genau temperierbaren Kopf der Zelle befindet sich eine Meßsonde mit zwei Thermistoren. Diese sind Bestandteile einer Wheatstoneschen Brückenschaltung. Mit Hilfe von zuvor im Zellenkopf temperierten Glasspritzen, die Lösungsmittel bzw. Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen enthalten, werden Tropfen möglichst gleicher Größe auf die Thermistoren gebracht.

Einer der Thermistoren wird ausschließlich mit Lösungsmittel betropft. Auf den zweiten Thermistor wird zunächst ebenfalls Lösungsmittel gebracht. Es besteht keine Temperaturdifferenz zwischen den beiden Tropfen, da sich Verdampfung und Kondensation die Waage halten. Nach Austausch eines der beiden Lösungsmitteltropfen gegen einen Lösungstropfen, beginnt an der Oberfläche dieses Tropfens aufgrund des geringeren Dampfdrucks Lösungsmittel zu kondensieren. Die dabei frei werdende Kondensationswärme erhöht die



Temperatur des Tropfens bis der Dampfdruck der beiden Tropfen wieder identisch ist. Die meßbare Temperaturdifferenz ist der Osmolalität der Lösung proportional. Die Meßwerte von Lösungen bekannter Konzentrationen einer möglichst nicht-assoziierenden Kalibriersubstanz wie Benzil ergeben eine Kalibriergerade. Mit Hilfe dieser Geraden ist es möglich, die Osmolalität weiterer Lösungen zu bestimmen. Die Lösungen werden durch Abwiegen von Substanz und Lösungsmittel hergestellt. Die Konzentrationsangabe erfolgt daher in mol/g Lösungsmittel d.h. molal.

Zur genauen Bestimmung der Osmolalität wird wie folgt vorgegangen: Zunächst wird durch wiederholtes Auftropfen des Lösungsmittels die Meßdauer ermittelt. Dies ist die Zeit, die zur Einstellung der Temperatur bei äquivalenter Kondensations- und Verdampfungsrate erforderlich ist. Anschließend können die Lösungen unterschiedlicher Molalität nacheinander untersucht werden. Die Osmolalität ist aus dem Wert berechenbar, den die Meßvorrichtung genau nach dem Zeitraum angibt, der zuvor mit reinem Lösungsmittel zur Temperatureinstellung ermittelt wurde. Die Angabe erfolgt in dimensionslosen, digitalen Einheiten [DIGIT].

Zunächst sollte der Assoziierungsgrad eines Morphiniumsalzes bei unterschiedlichen Konzentrationen ermittelt werden. Dazu wurden vier Lösungen mit steigender Molalität der Morphin-Base und der Benzoesäure hergestellt. Wie in der Versuchsreihe am U-Rohr-Modell wurde Chloroform als Lösungsmittel verwendet. Eine vorher angefertigte Kalibriergerade, deren Verlauf durch die Messung von vier Benzillösungen unterschiedlicher, bekannter Molalitäten ermittelt wurde, diente als Referenz. Sie zeigt den Osmolalitätswert, bei dem keine Assoziierung vorliegt.

Im Anschluß an die Osmolalitätsbestimmungen der reinen Base bzw. Säure, wurden gleiche Mengen der Lösungen vereint. Da sich die molale Konzentration der Lösungen dadurch nicht ändert, deutet die herabgesetzte Osmolalität, die aus

dem Verlauf der Osmolalitätskurve des Morphiniumbenzoats resultiert, (Abb. 31 und Tab. 8), auf eine Assoziation, d.h. die Bildung von Ionenpaaren hin. Dem Diagramm ist die in der Einleitung bereits angesprochene und mittels Massenspektrometrie nachgewiesene Assoziation von Morphinmolekülen zu entnehmen. Im Mittel assoziieren knapp 1,43 Moleküle. Erwartungsgemäß assoziieren beim Morphiniumbenzoat zwei Moleküle, da die Wechselwirkungsenergie der nun vorliegenden Ionen etwa fünffach höher ist, als die bei den nichtionischen Assoziaten wirksamen Wasserstoffbrücken- und Charge –Transfer Wechselwirkungen. Die massenspektrometrischen Ergebnisse haben aber gezeigt, daß im gelösten Salz zu geringen Teilen auch dimere Morphinassoziate vorliegen. Noch stärker assoziiert die Benzoesäure.

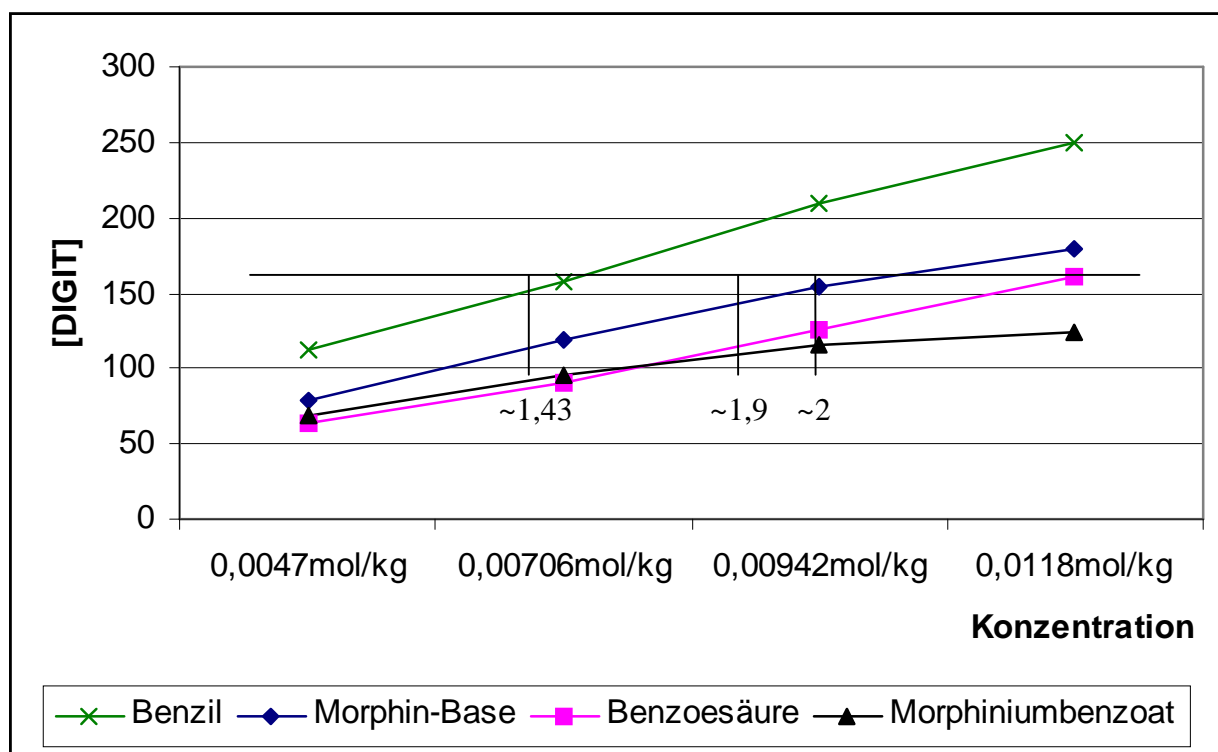


Abb. 31: Dampfdruckbestimmung der unterschiedlich konzentrierten Lösungen von Benzil, Morphin-Base, Benzoessäure und Morphiniumbenzoat in Chloroform

Molalität	Benzil	Morphin-Base	Benzoessäure	Morphiniumbenzoat
0,0047	109.5	79	64	69
0,00706	157	119,5	91	95
0,00942	210	154	126	116
0,0118	250	179	160,5	124

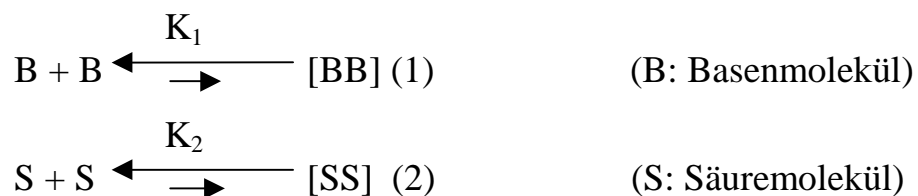
Tab.8: DIGIT-Werte der Dampfdruckbestimmungen von Benzil, Morphin-Base, Benzoesäure und Morphiniumbenzoat in Chloroform

### *9.2 Vergleich des osmotischen Druckes verschiedener Morphiniumsalzlösungen gleicher Konzentration*

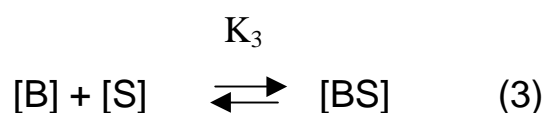
Um das Ausmaß der Assoziierung auch anderer Morphiniumsalze zu charakterisieren, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Neben Chloroform als Lösungsmittel wurden die Messungen in Isopropanol wiederholt. Einerseits sollte so das Assoziierungsverhalten von Morphiniumsalz-Ionenpaaren auch in einem polar-protischen Medium beobachtet werden, da bei der Hautpassage durch die wässrige Phase ebenfalls ein ähnliches Milieu herrscht. Andererseits besitzen nicht alle Salze in der erforderlichen Konzentration eine ausreichende Löslichkeit in Chloroform. Mit Isopropanol als Lösungsmittel konnten so Salze (z.B. Morphiniumnicotinat) untersucht werden, die in Chloroform aufgrund ungeeigneter Löslichkeitseigenschaften nicht untersuchbar waren, deren Permeationsfähigkeit durch Meerschweinchenhaut und das U-Rohr-Modell jedoch bereits gezeigt werden konnte.

Zur Durchführung dieser Messungen werden zunächst jeweils aequimolare Lösungen der Säure und der Morphin-Base hergestellt. Um einen direkten Vergleich zwischen den verschiedenen Salzen zu ermöglichen, werden sämtliche Lösungen in der gleichen Molalität hergestellt. Die Chloroformlösungen haben eine Konzentration von 0,005 mol/kg Lösungsmittel, die Isopropanollösungen eine von 0,0175 mol/kg Lösungsmittel.

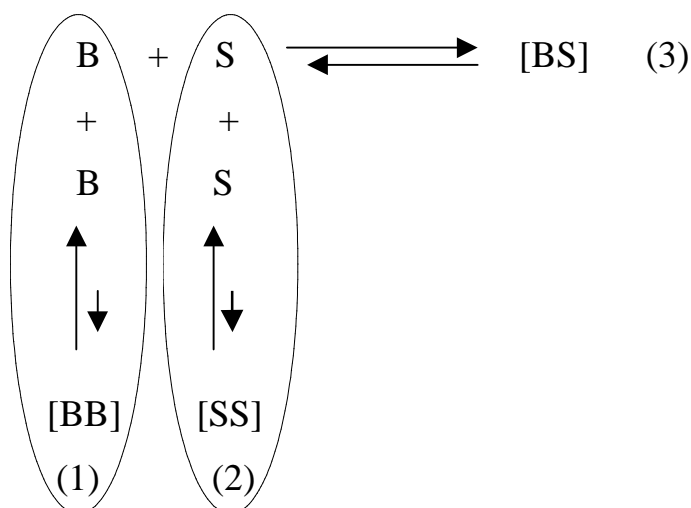
Bei den Bestimmungen des Gesamtassoziiierungsgrades und der einzelnen Konstanten muß die Bildung von Dimeren der Base (1) und der jeweiligen Säure (2) berücksichtigt werden.



Die Bildung des Morphiniumsalz-Ionenpaares (3) wird durch die Dimerisierung von Säure- bzw. Basenmolekülen beeinflusst. So unterliegt die Ionenpaarbildungsreaktion (3)



mit der Konstanten  $K_3$  den Einschränkungen (1) und (2):



Durch die mittels Massenspektrometrie nachgewiesene Bildung von Morphindimeren auch im Salz, wird die Konzentration an Morphinmonomer herabgesetzt. Gleiches gilt auch für die Säure. Das Gleichgewicht der Ionenpaarbildung (3) wird durch beide Prozesse nach links verschoben. Die Gesamtosmolalitätserniedrigung der Lösung ermöglicht keinen Rückschluß auf den Anteil der jeweiligen Assoziante.

Die Ionenpaarbildungskonstante  $K_3$  läßt sich daher nicht aus der Osmolalitätserniedrigung der Morphiniumsalzlösung im Verhältnis zu der einer Benzillösung berechnen. Nur die Gesamtassoziation, bzw. der Anteil an Monomeren, ergibt sich aus der Messung der Osmolalitätserniedrigung. Dennoch läßt sich überschlagen, daß fast ausschließlich Ionenpaare für die Osmolalitätserniedrigung der Salze verantwortlich sind und der Anteil an Morphin und Säuredimeren kaum eine Rolle spielt. Wenn man die zwischenmolekularen Wechselwirkungen der Tabelle 9 berücksichtigt, so wird die Wechselwirkungsenergie zwischen dem Morphiniumkation und einem Carbonsäureanion mindestens bei 30 KJ/mol liegen. (40 KJ/mol minus ca. 10 KJ/mol für eine hier fehlende Wasserstoffbrücke).

Bindungsart	Bindungsenergie kJ/mol
Verstärkte Ionenbindung	40
Ionenbindung	20
Wasserstoffbrückenbindung	4-17
Ion-Dipol Wechselwirkung	4-17
Dipol-Dipol Wechselwirkung	4-17
Charge Transfer Wechselwirkung	4-17
Hydrophobe Wechselwirkungen	4
Van der Waals Wechselwirkungen	2-4

Tab.9: Molekülwechselwirkungsenergien nach Zschunke<sup>60)</sup>

Damit ist sie etwa fünffach stärker, als alle übrigen möglichen Wechselwirkungen. Weiterhin wird durch die bevorzugte Bildung der Ionenpaare die Konzentration an Morphin-Base und freier Säure so gering, daß die Wahrscheinlichkeit an Morphin- bzw. Säuredimeren dramatisch sinkt. Deshalb sollte im Idealfall, ohne sterische Einflüsse des Säurerestes, die bei den Morphinsalzen gemessene Dampfdruckerniedrigung hauptsächlich mit den  $pK_s$ -

Werten der jeweiligen Säure korrelieren. In Tabelle 10 sind die Werte der Dampfdruckerniedrigung in [DIGIT] den  $pK_s$ -Werten gegenübergestellt und es ist ersichtlich, daß im Falle einiger Ionenpaare sterische Einflüsse des Säurerestes eine Rolle spielen und den Assoziierungsgrad beeinflussen.

Säure	$pK_s$ -Wert	[DIGIT] der Morphinium- salzlösung Isopropanol	[DIGIT] der Morphinium- salzlösung Chloroform
Salicylsäure	3,93 (1)	83 (4)	/
Phenoxyessigsäure	3,97 (2)	80 (1) [1]	42,6 (1) [1]
Ketorolac	4,92 (3)	/	54,2 (2)
Trimethylbenzoesäure	4,93 (4)	80,8 (2) [2]	68,2 (5) [3]
4-Brombenzoesäure	5,00 (5)	94,3 (8)	/
Flufenaminsäure	5,13 (6)	95,8 (10) [7]	66,6 (3) [2]
4-Phenylbuttersäure	5,40 (7)	95,6 (9) [6]	80,7 (11) [6]
2-Methoxybenzoesäure	5,52 (8)	81,5 (3)	/
4-tert Butylbenzoesäure	5,76 (9)	88,8 (7) [5]	74,1 (7) [5]
Benzoessäure	5,76 (10)	87 (6) [4]	69,9 (6) [4]
Ketoprofen	5,84 (11)	/	67,2 (4)
Sebacinsäuremonomethylester	5,97 (12)	86 (5) [3]	83 (12) [7]
Sebacinsäuremonoethylester	6,05 (13)	/	78,7 (9)
4-Hydroxybenzoesäure	6,06 (14)	102,5 (11)	/
Ibuprofen	6,13 (15)	/	76,8 (8)
Caprinsäure	6,41 (16)	/	79 (10)

Tab.10: Vergleich gemessener Osmometer [DIGIT] von Morphiniumsalzlösungen in zwei Lösungsmitteln mit den in Kapitel 7 gemessenen  $pK_s$ -Werten. In den runden Klammern ist die Rangfolge der Osmolalitätserniedrigung für das jeweilige Lösungsmittel angegeben; in den eckigen Klammern die Rangfolge der Osmolalitätserniedrigung für Salze, die in beiden Lösungsmitteln gemessen wurden

Da die  $pK_s$ -Werte in einem Isopropanol-Wasser-Gemisch ermittelt wurden, ist die Korrelation zwischen den  $pK_s$ -Werten und der Isopropanol-Reihe von besonderem Interesse. Um jedoch das Assoziierungsverhalten der Ionenpaare in beiden Lösungsmitteln miteinander vergleichen zu können, sind die Osmolalitätserniedrigungen der Morphiniumsalzlösungen in Chloroform mit aufgeführt.

Die Phenoxyacetatlösung und die Trimethylbenzoatlösung haben in beiden Lösungsmitteln eine niedrige Osmolalität. Der  $pK_s$ -Wert der Phenoxyessigsäure liegt mit 3,97 in der Rangfolge an zweiter Position. Nur der  $pK_s$ -Wert der Salicylsäure ist mit 3,93 noch kleiner. Deren Morphiniumsalzlösung zeigt in Isopropanol ebenfalls eine deutliche Osmolalitätserniedrigung, liegt jedoch mit 83 [DIGIT] hinter der Phenoxyacetatlösung innerhalb dieser Lösungsmittelreihe. In Chloroform fällt das Salicylat sofort aus. Deshalb ist eine Messung unmöglich.

Die  $pK_s$ -Werte der Trimethylbenzoesäure und des Ketorolacs liegen über dem der Phenoxyessigsäure. Sie korrelieren mit den Rangfolgen der Osmolalitätserniedrigungen ihrer Morphiniumsalzlösungen. Dabei ist zu berücksichtigen, daß der [DIGIT]-Wert der Trimethylbenzoesäure in der Isopropanolreihe nur 0,8 [DIGIT] über dem des Phenoxyacetats liegt.. Es zeigte sich bei weiteren Messungen, daß die Rangfolge der Osmolalitätserniedrigung für die Salzlösungen des 4-Brombenzoats, des Flufenamats und des 4-Phenylbutanats hier nicht mit der  $pK_s$ -Erhöhung der freien Säure korreliert.

Die Osmolalität der 4-Phenylbutanatlösung, der 4-tert-Butylbenzoatlösung und der Benzoatlösung fällt sogar in Isopropanol mit steigendem  $pK_s$ -Wert der freien Säuren ab.

Die Osmometerwerte des 4-tert-Butylbenzoats, des Benzoats und des Monomethylsebacats liegen in der Isopropanolrangfolge dicht zusammen. Am Schluß der Tabelle korrelieren die Rangfolgen der Osmolalitätserniedrigungen

wieder mit den steigenden  $pK_s$ -Werten der freien Säuren. Die Osmolalitätswerte weiterer Morphiniumsalzlösungen sind im praktischen Teil aufgeführt.

Die Abweichungen in der Korrelation der Osmolalitätswerte zu den  $pK_s$ -Werten können durch sterische Einflüsse des Säurerestes verursacht werden.

Um darüber Aufschluß zu erlangen, wurden im folgenden Kapitel Ionenpaare mit Hilfe der  $^1H$ -NMR-Spektroskopie untersucht.



## **10. 1H-NMR-Spektroskopische Untersuchungen von Morphiniumsalz Ionenpaaren**

### *10.1 Das Spektrum der Morphin-Base*

Die Resonanzfrequenz (chemische Verschiebung) eines Protons ist abhängig vom äußeren, angelegten Magnetfeld und einem diesem entgegenstehenden, das durch die darum befindlichen Elektronen erzeugt wird. Dabei sind die diamagnetischen Komponenten stärker ausgeprägt, als die paramagnetischen. Deshalb kann man mit der Resonanzfrequenz Aussagen über die elektronische Umgebung eines Protons machen.

Die Bildung von Assoziaten beeinflusst die Elektronenverteilung innerhalb der Moleküle der einzelnen Partner, da die Assoziate durch intermolekulare Wechselwirkungen wie beispielsweise Wasserstoffbrücken-bindungen, van der Waals-Kräfte oder Ionenbindungen stabilisiert werden. Alle diese Wechselwirkungen haben Veränderungen der Elektronenverteilung innerhalb der im Assoziat enthaltenen Moleküle zur Folge, aus der wiederum eine Veränderung der chemischen Verschiebung betroffener Protonenresonanzsignale resultiert. Assoziatbildungen können also mittels NMR-Spektroskopie nachgewiesen und beschrieben werden<sup>61)</sup>. Neben 1-H NMR-spektroskopischen Untersuchungen von supramolekularen Komplexen wird auch die 15N NMR-Spektroskopie zur Charakterisierung von Komplexen eingesetzt<sup>62)</sup>.

Zur Untersuchung von Morphiniumsalz-Ionenpaaren wurden zunächst die Protonenresonanzsignale der Morphin-Base eindeutig zugeordnet. (Abb.32 u. Tab.11)

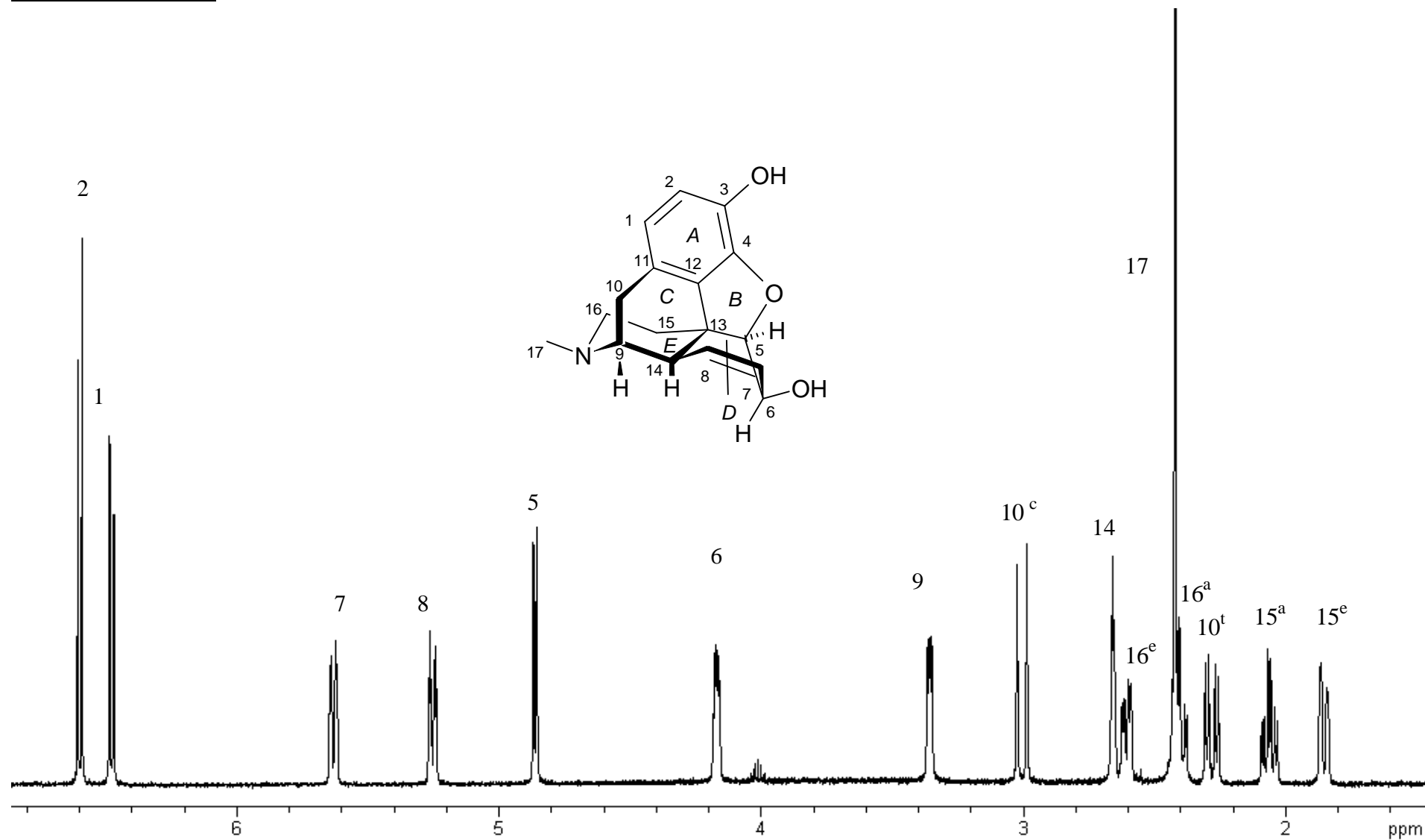


Abb.32: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum, 500 MHz von Morphin (1), CDCl<sub>3</sub>, 10c= cis-Stellung zu H-C9; 10t=trans-Stellung zu H-C9

H-C <sub>n</sub>	2	1	7	8	5	6	9
ppm	6,6	6,48	5,63	5,25	4,863	4,17	3,36
Signalform	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>m</i>	<i>m</i>
Kopplungs-konstante	$^3J_{1/2}$ =8,2	$^3J_{1/2}$ =8,2	$^3J_{7/8}$ =10	$^3J_{7/8}$ =10	$^3J=5,5$		

H-C <sub>n</sub>	10c	14	16e	17	16a	10t	15a	15e
ppm	3,0	2,66	2,60	2,42	2,40	2,28	2,06	1,85
Signalform	<i>d</i>	<i>m</i>	<i>dd</i>	<i>s</i> ,3H	<i>m</i>	<i>dd</i>	<i>dd</i>	<i>d</i>
Kopplungs-konstante	$^2J_{10c/10t}$ =18,9		$^2J_{16a/16e}$ =12,3  $^3J=4,6$			$^2J_{10c/10t}$ =18,9  $^3J=6,3$	$^2J_{15a/15e}$ =12,7  $^3J=5$	$^2J_{15a/15e}$ =12,7

Tab.11: Chemische Verschiebungen und Multiplizitäten der Protonenresonanzsignale der Morphin-Base in Deuteriochloroform

Die Protonenresonanzsignale der Methylenbrückenwasserstoffe an C15 und C16 im Piperidinteil des Moleküls weisen, abhängig von ihrer Stellung zur Ringebene (e: aequatorial, a: axial), unterschiedliche chemische Verschiebungen auf. Die Resonanzsignale der beiden Protonen am C10 unterscheiden sich durch ihre Stellung zum Proton am C9, dessen Resonanzsignal bei 3,36 ppm als Multiplett erscheint. Das Signal des zum C9-H trans-ständigen Protons erscheint bei 2,28 ppm als Doppeldublett, das des zum C9-H cis-ständigen, dem Piperidinring abgewandten Protons, bei 3 ppm als Dublett. Deutlich ist bei 2,42 ppm das Singulett der drei Methylgruppenprotonen am C17 zu erkennen. Die Protonen der Kohlenstoffe 9, 16 und 17 bilden eine erste Peripherie um den basischen Stickstoff. Die Veränderung der Elektronenverteilung durch die Protonierung des Stickstoffes hat hier das größte Ausmaß. Eine zweite Peripherie bilden die Protonen der Kohlenstoffe 10, 14 und 15.

### *10.2 Vergleich der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren des Morphiniumtrimethylbenzoats mit Morphin-Base und Morphiniumformiat in Deuteriochloroform*

Die Protonierung der Base durch eine Säure stellt den ersten Schritt der Ionenpaarbildung dar. Zunächst wurde untersucht, ob die hierdurch hervorgerufenen Veränderungen der Elektronenverteilung innerhalb des Morphinmoleküls im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum sichtbar sind. Da Morphiniumhydrochlorid in Deuteriochloroform nahezu unlöslich ist, die Messungen jedoch aufgrund besserer Vergleichsmöglichkeit mit den bereits durchgeführten Untersuchungen im gleichen Lösungsmittel durchgeführt werden sollten, wurde auf das Morphiniumformiat ausgewichen. Dessen Löslichkeit ist zur Aufnahme eines Spektrums ausreichend. Da die Ameisensäure keinen Alkyl- oder Arylrest besitzt, kann das Protonenspektrum durch diese nicht beeinflusst werden. Abbildung 33b zeigt das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des Morphiniumformiats in Deuteriochloroform. Um über die Geometrie des Salzes einer aromatischen Carbonsäure etwas in Erfahrung zu bringen, wurde zum Vergleich das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von Morphiniumtrimethylbenzoat (Abb. 33c) aufgenommen und die Werte der chemischen Verschiebungen der einzelnen Protonenresonanzsignale mit denen des Morphiniumformiatspektrums verglichen.

Die Tabelle 12 enthält neben den chem. Verschiebungen der Resonanzsignale des Morphins, Morphinium-formiats und –trimethylbenzoats, zur besseren Übersicht auch die Differenzen der chemischen Verschiebungen für die Signale des jeweiligen Salzes.

Dabei zeigt sich, daß aufgrund der geringeren Säurestärke der Trimethylbenzoesäure nur die Hälfte der Morphinmoleküle im Vergleich zum Morphiniumformiat protoniert vorliegen. Halbiert man nämlich die Protonierungsverschiebung des Morphiniumformiats, so resultieren die Protonierungsverschiebungen des Morphiniumtrimethylbenzoats.

Tabelle 12 beinhaltet eine Zeile mit berechneten chemischen Verschiebungen des Morphiniumtrimethylbenzoat für einen, dem Morphiniumformiat

entsprechenden, Protonierungsgrad. Hierzu wurde der Quotient aus den Differenzen der chemischen Verschiebungen eines Protons zwischen Morphiniumformiat und Base sowie Morphiniumtrimethylbenzoat und Base gebildet. Mit dem so erhaltenen Faktor (f) wurden sämtliche  $\Delta ppm$ -Werte zwischen der Morphin-Base und dem Morphiniumbenzoat multipliziert und zu dem  $\Delta ppm$ -Wert der Morphin-Base addiert. Zur Berechnung des Faktors (f) wurde das Proton 16a herangezogen, da dieses eine zum Morphinmolekül hingewandte Stellung einnimmt und so nicht durch den aromatischen Säurerest beeinflusst wird.

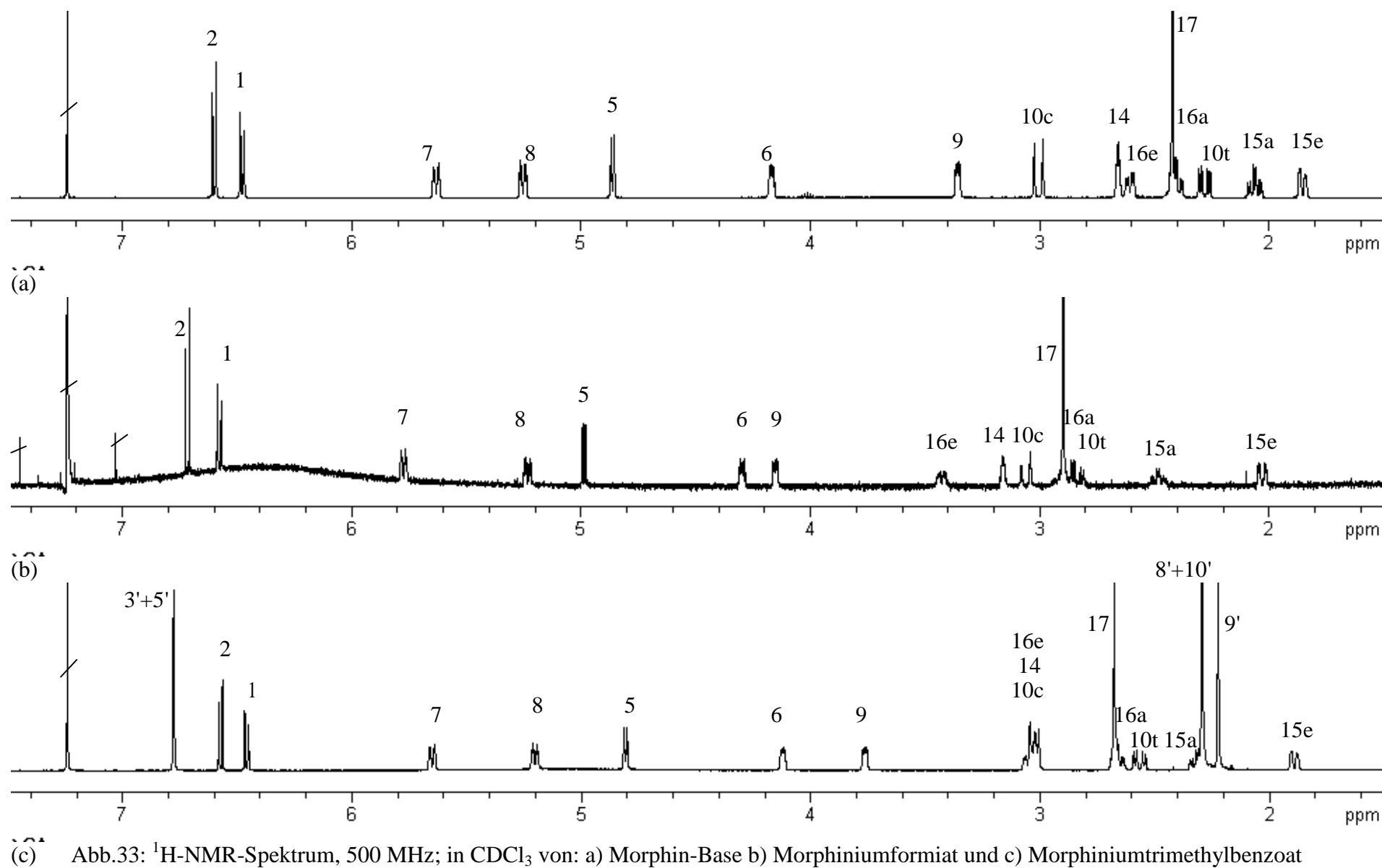
Da auch bei den anderen Protonen kein Einfluß durch den Anisotropiekegel des Aromaten festzustellen ist, kann gefolgert werden, daß der Aromat nicht unterhalb des Cyclohexenrings positioniert ist, sondern im Mittel eine vom Morphin abgewandte Lage einnimmt. Da aber das vom Protonierungsort sehr weit entfernte H-5 des Morphiniumtrimethylbenzoats nicht wie im Formiat 0,12 ppm Tieffeld, sondern 0,12 ppm Hochfeld verschoben ist, muß der Aromat des nächsten Morphiniumtrimethylbenzoatmoleküls mit seinem Anisotropiekegel im Mittel an dieser Stelle positioniert sein. Dies wird abgesichert durch die gleichsinnige Beeinflussung von H-6.

### *10.3 Vergleich der $^1H$ -NMR-Spektren des Morphiniumtrimethylbenzoats mit Morphin-Base und Morphiniumformiat in Deuteromethanol*

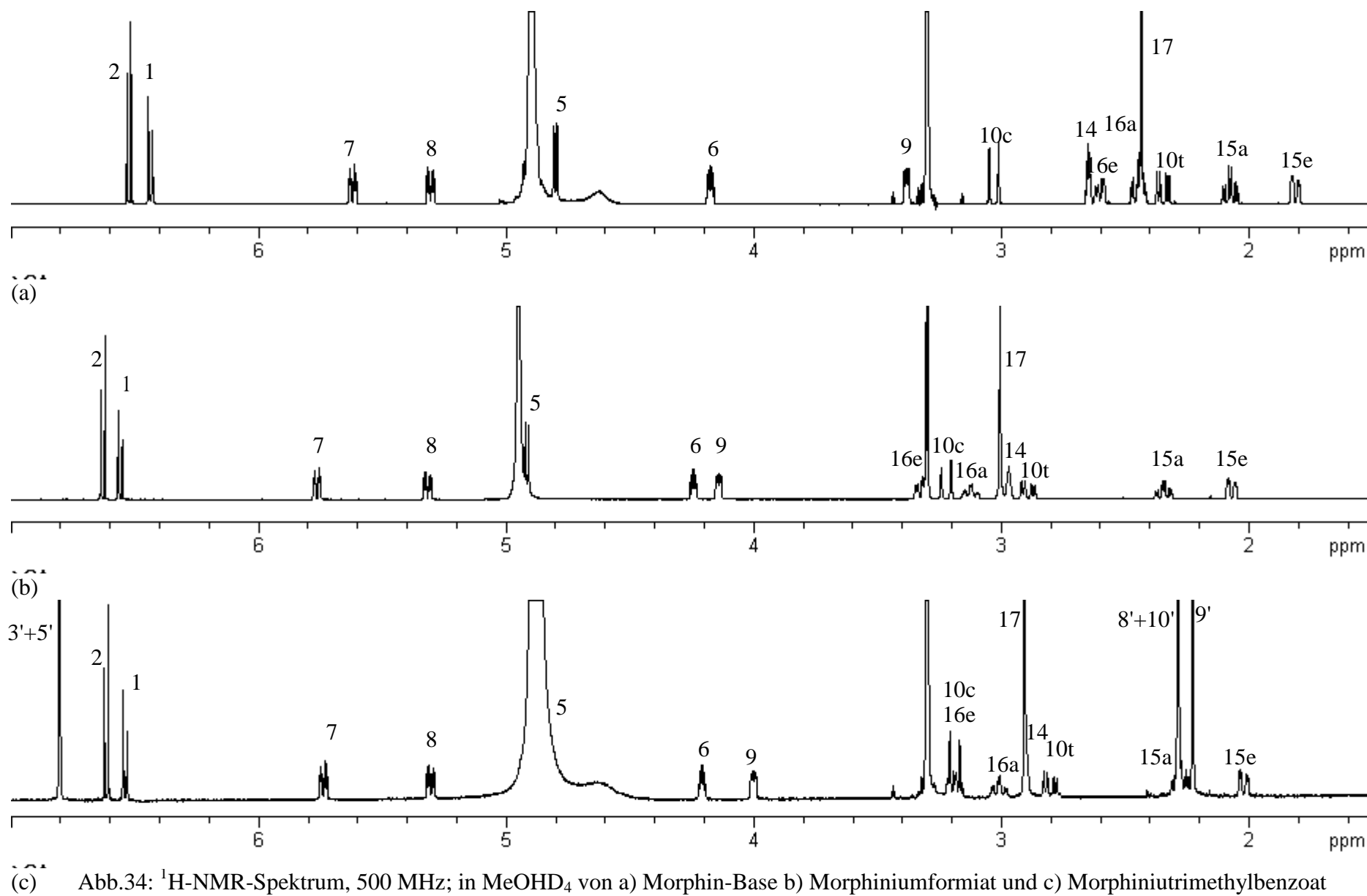
Bei der Verwendung von Deuteromethanol als Lösungsmittel ( Abb. 34) zeigte sich, daß die Protonierungseffekte denen in Deuterochloroform entsprechen, durch den nivellierenden Effekt des protischen Lösungsmittels jedoch alle Veränderungen im Spektrum abgeschwächt sind. Die Abbildung 34 enthält die NMR-Spektren der Morphin-Base (34a), des Morphiniumformiats (34b) -in dem deutlich die Protonierungsverschiebung zu erkennen ist- und des Morphiniumtrimethylbenzoats (34c). Die Tabelle 13 enthält wiederum neben den gemessenen ppm-Werten der Morphin-Base, des Morphiniumformiats und des Morphiniumtrimethylbenzoats die berechneten chemischen Verschiebungen

des Morphiniumtrimethylbenzoats in Deuteromethanol. Der mit Hilfe der chemischen Verschiebung des Protons 16a experimentell ermittelte Umrechnungsfaktor (f) beträgt hier 1,23. Nachdem gezeigt werden konnte, daß die Hautpermeation von Morphin durch die Bildung von Ionenpaaren mit organischen Carbonsäuren signifikant gesteigert werden kann, sollte im Anschluß untersucht werden, ob dieser Effekt auch mit anderen Opiatbasen zu erzielen ist. Dazu wurden die entwickelten Methoden an den Opiatbasen Hydromorphon(45) und Diamorphin (Heroin) (46) angewandt. Zuvor sollte jedoch nach einer Möglichkeit gesucht werden, die es erlaubt, die Wirkstoffpermeation und systemische Aufnahme in vivo zu verfolgen.

## Theoretischer Teil



## Theoretischer Teil





## Theoretischer Teil

Proton	2	1	7	8	5	6	9	10c	14	16e	17	16a	10t	15a	15e
$\delta$ (ppm) Morphin-Base	6,06	6,48	5,63	5,25	4,86	4,17	3,36	3,00	2,66	2,60	2,42	2,40	2,40	2,06	1,85
$\delta$ (ppm) Morphinium-formiat	6,71	6,57	5,78	5,23	4,98	4,30	4,16	3,06	3,16	3,43	2,90	2,90	2,84	2,45	2,03
$\delta$ (ppm) Morphinium-trimethylbenzoat (gemessen)	6,57	6,45	5,65	5,20	4,80	4,12	3,76	3,02	3,02	3,05	2,67	2,66	2,56	2,31	1,89
$\delta$ (ppm) Morphinium-trimethylbenzoat (berechnet)	6,66	6,42	5,67	5,15	4,74	4,07	4,13	3,04	3,35	3,46	2,90	2,89	2,71	2,54	1,93
$\Delta$ -ppm: Base-Formiat	-0,11	-0,09	0,15	-0,02	0,12	0,13	0,80	0,06	0,50	0,83	0,48	0,50	0,44	0,39	0,18
$\Delta$ -ppm: Base-Trimethylbenzoat (berechnet)	-0,06	-0,06	0,04	-0,10	-0,12	-0,10	0,77	0,04	0,69	0,86	0,48	0,49	0,31	0,48	0,08
$\Delta$ -ppm: Formiat-Trimethylbenzoat (berechnet)	-0,05	-0,15	-0,11	-0,08	-0,24	-0,23	-0,03	-0,02	0,19	0,03	0	-0,01	-0,13	0,09	-0,10

Tab.12: chemische Verschiebungen (ppm) der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren; 500 MHz von: Morphin-Base; Morphiniumformiat und Morphiniumtrimethylbenzoat in Deuteriochloroform, sowie die berechneten chemischen Verschiebungen des Morphiniumtrimethylbenzoats bei gleichem Protonierungsgrad wie Morphiniumformiat in Deuteriochloroform

Proton	2	1	7	8	5	6	9	10c	14	16e	17	16a	10t	15a	15e
$\delta$ (ppm) Morphin-Base	6,52	6,43	5,62	5,30	4,80	4,17	3,38	3,03	2,65	2,60	2,43	2,45	2,35	2,07	1,81
$\delta$ (ppm) Morphinium-formiat	6,63	6,56	5,76	5,23	4,91	4,24	4,14	3,23	2,97	3,33	3,00	3,12	2,89	2,34	2,01
$\delta$ (ppm) Morphinium-trimethylbenzoat (gemessen)	6,61	6,54	5,77	5,30	4,88	4,24	4,00	3,19	2,91	3,19	2,91	3,01	2,80	2,28	2,02
$\delta$ (ppm) Morphinium-trimethylbenzoat (berechnet)	6,63	6,56	5,77	5,30	4,90	4,22	4,14	3,23	2,97	3,32	3,03	3,14	2,90	2,33	2,07
$\Delta$ -ppm: Base-Formiat	0,11	0,13	0,14	0,02	0,11	0,07	0,76	0,20	0,32	0,73	0,57	0,67	0,54	0,27	0,20
$\Delta$ -ppm: Base-Trimethylbenzoat (berechnet)	0,11	0,13	0,15	0	0,10	0,05	0,76	0,20	0,32	0,72	0,60	0,69	0,55	0,26	0,26
$\Delta$ -ppm: Formiat-Trimethylbenzoat (berechnet)	0	0	0,01	-0,02	-0,01	-0,02	0	0	0	-0,01	0,03	0,02	0,01	-0,01	0,06

Tab.13: chemische Verschiebungen (ppm) der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren; 500 MHz von: Morphin-Base; Morphiniumformiat und Morphiniumtrimethylbenzoat in Deuteriochloroform, sowie die berechneten chemischen Verschiebungen des Morphiniumtrimethylbenzoats bei gleichem Protonierungsgrad wie Morphiniumformiat in Deuteromethanol.

## **11. Entwicklung einer neuen Methode zur Extraktion von Morphin aus Rattenhirn, sowie dessen quantitativen Bestimmung.**

Die bisherigen Untersuchungen zur Hautpermeation von Morphiniumsalzen wurden an präparierter Meerschweinchenhaut durchgeführt. Durch das begrenzte Angebot an Humanhaut und den hohen Preis der Meerschweinchenhautstanzlinge (ca 70 DM/Stanzling) wird heute auch Kuheuterhaut eingesetzt. Durch die ausschließliche Verwendung der Haut von Meerschweinchen einer Rasse bzw. die große Zahl von Hautstanzlingen (bis zu 120), die aus dem Euter **einer** Kuh gewonnen werden, in Kombination mit einem künstlichen und reproduzierbaren Akzeptormedium, gelingt es, die Streureate der Messungen so gering wie möglich zu halten. Nachteil dieser Methoden ist jedoch, daß einerseits aktive Transportprozesse nicht erfaßt werden, andererseits die Konzentration des Arzneistoffes nach der Hautpermeation im Akzeptormedium, nicht jedoch am Wirkort bestimmt wird. Das Ausmaß der Analgesie des Morphins hängt von dessen Konzentration im zentralen Nervensystem ab. Im Blut ist es zu einem großen Teil an Plasmaeiweiß gebunden. Die quantitative Erfassung des Morphingehalts im Hirn gibt somit genaueren Aufschluß darüber, ob eine ausreichende Konzentration für eine pharmakologische Wirkung vorhanden ist.

Die bisherige Methode erfaßt jedoch lediglich die passive Diffusion durch die Haut. Aufgrund der hohen Permeationssteigerung, die durch die Verwendung von Morphiniumsalzen gemessen werden konnte, eröffnete sich die Möglichkeit, Morphin im zentralen Nervensystem zu bestimmen. Eine solche Methode ist für die Optimierung der Galenik eines Morphin-TTS von großem Nutzen.

Zunächst wurde eine neue Probenaufarbeitungsmethode entwickelt. Bisher wurde Morphin aus biologischen Proben durch Phasenextraktionsmethoden gewonnen<sup>63)</sup>. Bei der Reproduktion dieser Methoden stellte sich jedoch heraus, daß zwar nahezu alle störenden Substanzen, wie Neurotransmitter o.ä., entfernt

werden können, sie jedoch sehr arbeitsaufwendig sind und durch die vielen Arbeitsschritte die Gefahr besteht, kleinere Morphinmengen zu verlieren. So wurde eine vereinfachte, zeitsparende Methode entwickelt, mit deren Hilfe Morphin in **wenigen** Schritten aus dem Gehirn extrahiert werden kann und somit auch der Verlust von Morphin reduziert wird. Es verbleiben zwar neben dem gesuchten Morphin weitere Substanzen im Extrakt, diese sollten jedoch durch eine entsprechende HPLC-Applikation vom Morphin getrennt werden, oder deren Peakfläche von der des Morphinpeaks subtrahiert werden. Als mobile Phase wurde ein bereits bekanntes Citratpuffer-Ionenpaarreagenz eingesetzt<sup>64)</sup>. Eine HD-RP18-Säule bildete die stationäre Phase. Aufgrund der geringen Mengen von Morphin im Hirngewebe eignet sich besonders die elektrochemische Detektion zur Morphinbestimmung. Bei dieser Methode liegt das optimale Detektionspotential bei 900 mV. Morphin konnte so noch in einer Konzentration von  $10^{-8}$  mol/l nachgewiesen werden.

In einem Vorversuch wurde einer Wistar-Ratte ein Morphinium-N-acetylglycinathaltiges Hautpflaster für 48 Stunden auf den von Haaren befreiten Rücken aufgeklebt. Nach Dekapitation wurden dieser Ratte, sowie einer weiteren, unbehandelten Ratte, das Gehirn entnommen und in Kleinhirn, Striatum, Cortex und das Restgewebe zerlegt. Zunächst wurden jeweils 180 mg des Restgewebes in Methanol aufgenommen und mit einem Ultraturrax fein zerkleinert. Die Proteinfällung wurde aufgrund der möglichen Apomorphinbildung im Sauren nicht mit Perchlorsäure, sondern mit Methanol durchgeführt. Nach erfolgter Zerkleinerung wurde die Extraktion weiter im Ultraschallbad fortgeführt. Anschließend erfolgte die Abtrennung der Gewebereste durch Zentrifugieren. Dem abdekantierten Überstand wurde in einer Vakuumzentrifuge das Lösungsmittel entzogen. Der Rückstand wurde mit 0,01N Salzsäure aufgenommen und mit Microcon-3 Filtereinheiten in einer Ultrazentrifuge filtriert. Die Membran dieser Filter hält Substanzen mit einem

Molekulargewicht über 3000 g/mol zurück und ist so zur Abtrennung störender Proteine geeignet. Jeweils 100 µl des Filtrats wurden auf Morphin untersucht.

Abbildung 35a zeigt das Chromatogramm des Extraktes aus dem Restgewebe des Gehirns der unbehandelten Ratte. Neben einer Reihe von sich überschneidenden Signalen mit einer Retentionszeit bis sechs Minuten erscheinen im weiteren Verlauf des Chromatogramms noch sechs Peaks, von denen die letzten drei ebenfalls nicht vollständig getrennt sind. Die Peaks der Blindprobe wurden nicht weiter untersucht. In Abbildung 35b ist das Chromatogramm des Extraktes der mit Morphin-Hautpflaster behandelten Ratte gezeigt. Deutlich ist die Signalintensität des Peaks mit der Retentionszeit von 21,54 Minuten gestiegen. Um festzustellen, ob diese Intensitätszunahme auf vorhandenes Morphin zurückzuführen ist, wurde der Probe etwas Morphinhydrochlorid Lösung hinzugefügt und wiederum ein Chromatogramm angefertigt (Abb.35c). Eine weitere Zunahme der Signalintensität war die Folge. Durch die mit Hilfe des Blindversuches festgestellte Überlagerung zweier Signale ist eine direkte Bestimmung der Morphinkonzentration nicht möglich. Um trotzdem den Morphingehalt zu erfassen, kann nun folgendermaßen vorgegangen werden: Anhand einiger Blindproben wird ermittelt, welcher vollständig getrennte und nicht vom Morphin überlagerte Peak des Chromatogrammes immer im gleichen Intensitätsverhältnis zu dem durch Morphin überlagerten steht. Von der Gesamtfläche des zu bestimmenden Peaks einer morphinhaltigen Probe kann so der zu berechnende Anteil der zweiten, unbekannten Substanz subtrahiert werden. Mit Hilfe der entwickelten Methode ist es also möglich, die in-vivo-Applikation morphinhaltiger TTS zu untersuchen.

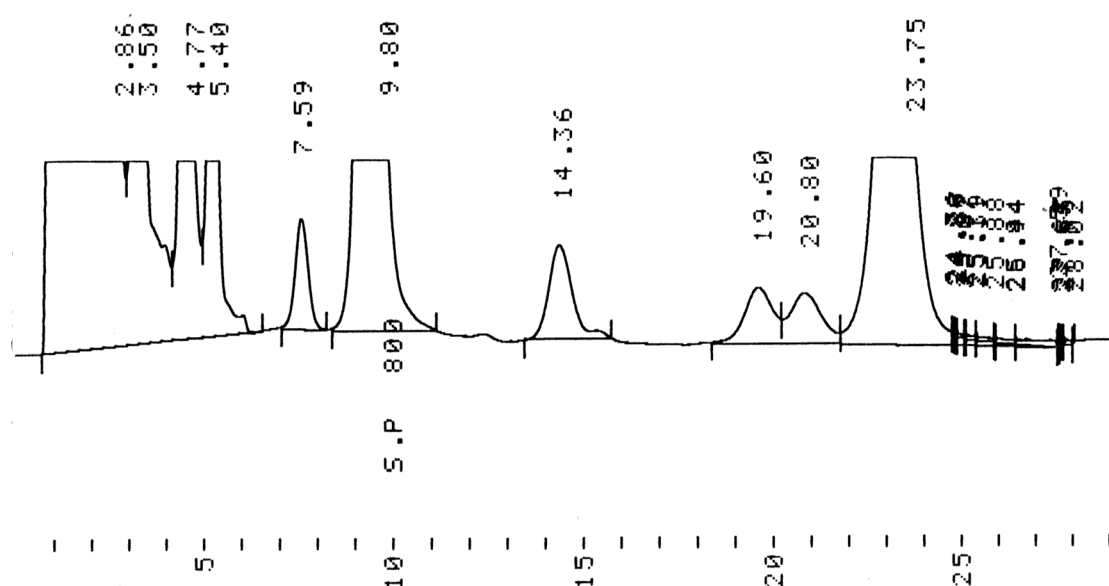


Abb.35a: Chromatogramm des Resthirnextraktes einer nicht behandelten Ratte

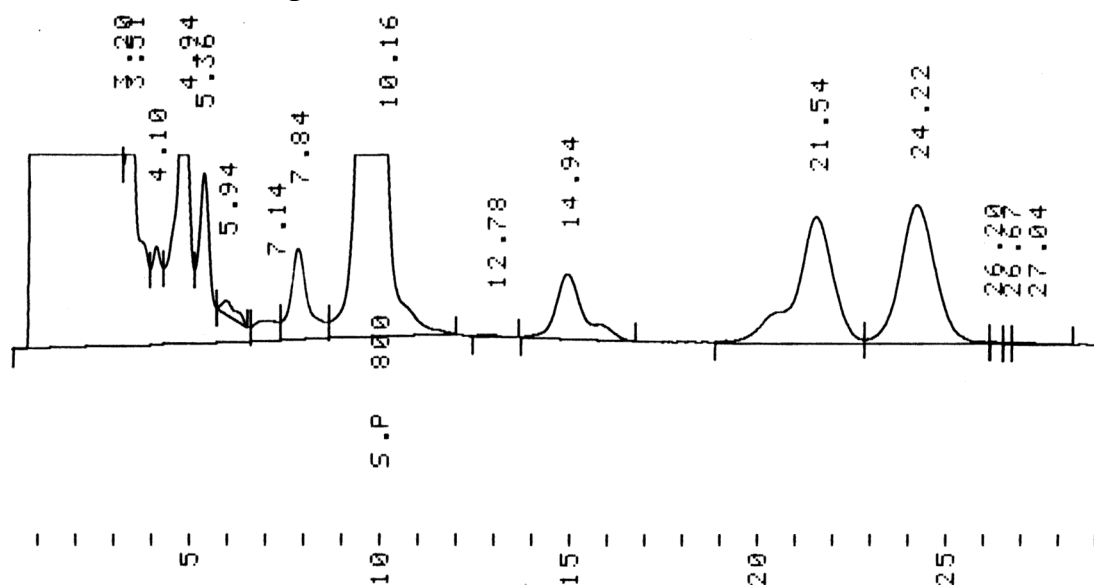


Abb.35b: Chromatogramm des Resthirnextraktes einer mit Morphin-Hautpflaster behandelten Ratte

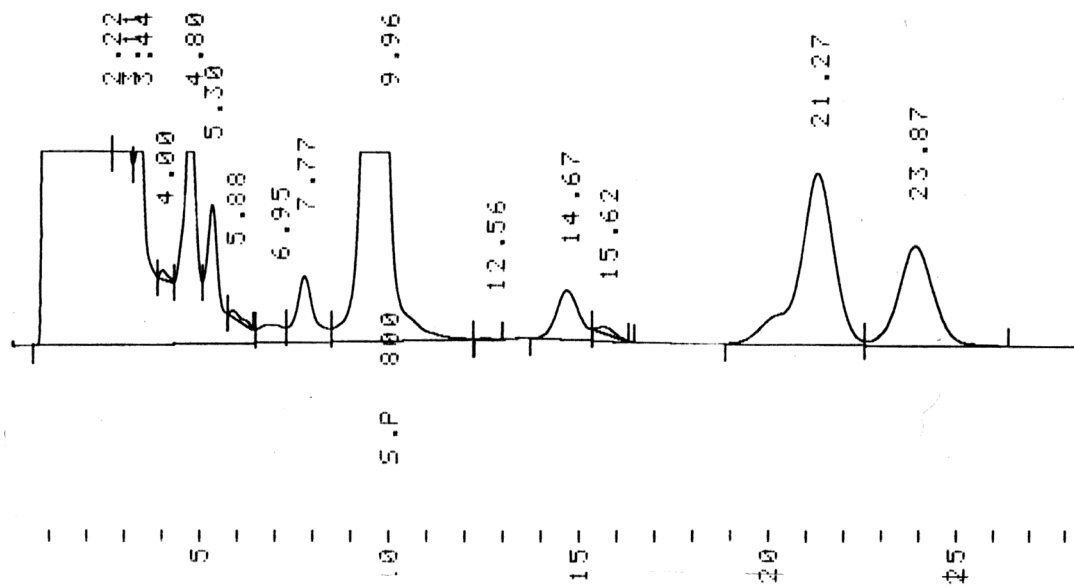


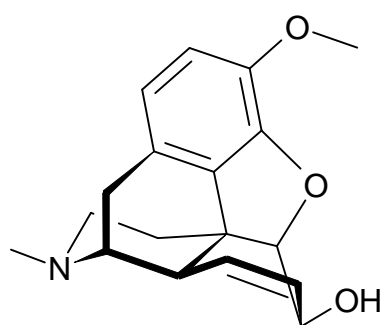
Abb.35c: Probenlösung des Chromatogrammes aus Abbildung 34b, mit Morphinhydrochlorid-Lösung versetzt.

## 12. Untersuchung der Hautpermeation von Hydromorphon und dessen organischen Säureadditionssalzen sowie deren Charakterisierung.

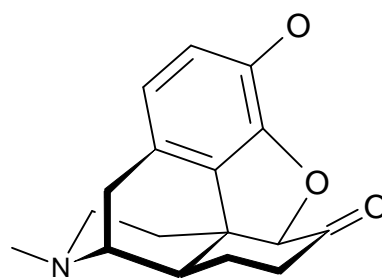
### 12.1 Chemische und pharmakologische Eigenschaften des Hydromorphons

Durch Variation der Morphinstruktur lassen sich einzelne Wirkeigenschaften hervorheben. So führt beispielsweise die Etherbildung der phenolischen OH-Gruppe beim Codein (**42**) zu einer Verstärkung des antitussiven Effektes.

Die Oxidation der alkoholischen Gruppe bei gleichzeitiger Hydrierung der Doppelbindung bewirkt eine Erhöhung der analgetischen Wirksamkeit des Morphins. Die durch diese Veränderungen aus Morphin erhaltene Verbindung Hydromorphon (Oxymorphon) (**43**) hat eine um den Faktor 10 stärkere analgetische Wirkung als Morphin<sup>65)</sup>.



Codein (**42**)



Hydromorphon (**43**)

Hydromorphon besitzt einen Schmelzpunkt von 248,5°C. Die Verbindung ist löslich in siedendem Aceton und Chloroform (Morphin ist hier nur schwer löslich). Die Substanz ist, wie Morphin, gut löslich in wässrig-alkalischen Milieu und mäßig löslich in siedendem Ethanol. In Benzol ist Hydromorphon nur schwerlöslich<sup>66)</sup>.

Durch die im Vergleich zu Morphin höhere analgetische Aktivität des Hydromorphons genügt eine geringere resorbierte Wirkstoffmenge, um einen pharmakologischen Effekt zu erzielen.

Dadurch ist Hydromorphon für eine transdermale Applikation attraktiv. Diese gelang bisher in ausreichendem Maße lediglich unter Einsatz von Enhancern, die, wie bereits erwähnt, jedoch zu Hautirritationen führen können<sup>67)</sup>.

Die am Beispiel des Morphins entwickelten Modelle zum Nachweis und der Charakterisierung der Säureadditionssalze sollten zur Untersuchung von Hydromorphoniumsalzen herangezogen werden. Das Ziel war festzustellen, ob sich Ionenpaare bilden, die in der Lage sind, die Hydromorphonpermeation durch eine lipophile Membran zu verstärken.

### *12.2 Untersuchung des Permeationsverhaltens von Hydromorphoniumsalzen im U-Rohrmodell.*

Wie in Kapitel 5 beschrieben, wurden die in Tabelle 14 aufgeführten organischen Säureadditionssalze des Hydromorphons auf ihre Permeationseigenschaften im U-Rohr untersucht.

Die Ergebnisse sind der Tabelle 14 zu entnehmen.

Die höchsten Hydromorphonkonzentrationen im Akzeptormedium erreichen das Hydromorphonium-4-aminobenzoat mit 3,84 mg/ml und das Hydromorphonium-2-methoxybenzoat mit 3,75 mg/ml. Dieser Spitzengruppe folgen das Phenoxyacetat, das Benzoat und das Hippurat, die mit Hydromorphonkonzentrationen um 2,7 mg/ml um etwa 1 mg/ml hinter der ersten Gruppe zurückliegen. Das Nicotinat erreicht nach 48 Stunden eine um über 1,2 mg/ml geringere Hydromorphonkonzentration von 1,27 mg/ml im Akzeptormedium. Den Abschluß der organischen Hydromorphoniumsalze bildet eine Gruppe von drei Salzen. Das Monomethylsebacat, das 4-Hydroxybenzoat und das Caprinat erreichen jeweils Hydromorphonkonzentrationen unter 0,4 mg/ml. Damit liegen sie jedoch noch oberhalb der freien Base, die mit 0,063 mg/ml nahezu den geringsten Wert erreicht. Nur das



Hydromorphoniumhydrochlorid liegt noch darunter. Hier konnte auch nach 48 Stunden kein Hydromorphon im Akzeptormedium nachgewiesen werden.

<b>Hydromorphoniumsalz</b>	<b>Hydromorphonkonzentration in der wässrigen Akzeptorphase nach 48h</b>
Hydromorphonium-4-aminobenzoat	3,84 mg/ml
Hydromorphonium-2-methoxybenzoat	3,75 mg/ml
Hydromorphoniumphenoxyacetat	2,79 mg/ml
Hydromorphoniumbenzoat	2,7 mg/ml
Hydromorphoniumhippurat	2,55 mg/ml
Hydromorphoniumnicotinat	1,27 mg/ml
Hydromorphoniummonomethylsebacat	0,38 mg/ml
Hydromorphonium-4-hydroxybenzoat	0,22 mg/ml
Hydromorphoniumcaprinat	0,084 mg/ml
Hydromorphon-Base	0,063 mg/ml
Hydromorphoniumhydrochlorid	0 mg/ml

Tab.14: Hydromorphonkonzentration in der wässrigen Akzeptorphase nach 48 h bei Applikation verschiedener Säureadditionssalze und der freien Base

Wie bereits am Beispiel des Morphins gezeigt, lässt sich auch bei Hydromorphon die Permeationsrate im U-Rohr durch den Einsatz organischer Carbonsäuresalze steigern. Mit Hilfe von massenspektrometrischen Untersuchungen, Dampfdruckmessungen und der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie wurde untersucht, ob diese Permeationssteigerungen ebenfalls mit der Bildung von Ionenpaaren und den damit verbundenen Änderungen der physikochemischen Eigenschaften zu erklären sind.

### 12.3 Massenspektrometrische Untersuchungen von Hydromorphoniumsalzen.

Wie schon am Beispiel des Morphins gezeigt, sollte mit der bereits beschriebenen Methode des APCI-Verfahrens untersucht werden, ob Hydromorphon ebenfalls in der Lage ist, stabile Ionenpaare zu bilden.

Zunächst wurde festgestellt, ob Hydromorphon wie Morphin detektierbare Dimere bildet. Das Massenspektrum in Abbildung 36 zeigt Hydromorphon-Base in Isopropanol gelöst.

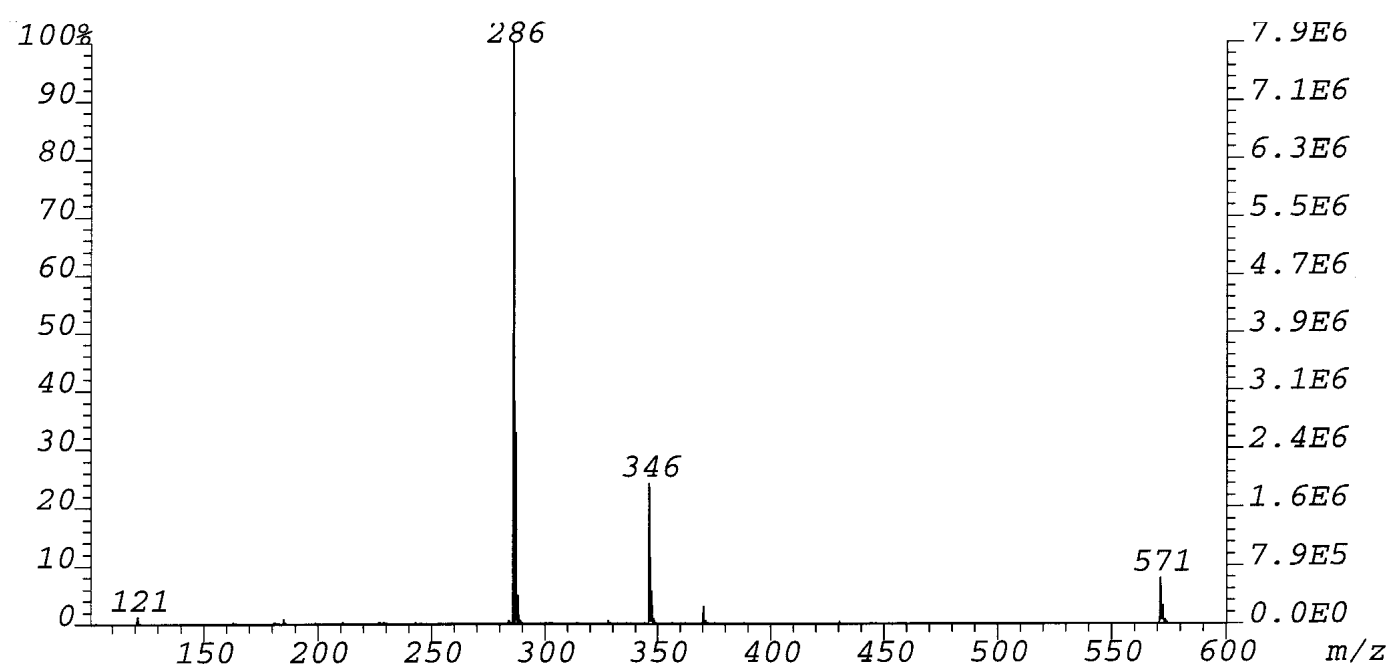


Abb.36: APCI-Massenspektrum der Hydromorphon-Base; Isopropanol; C/S= 6%/6%

Deutlich ist der  $[\text{Hydromorphon}+\text{H}]^+$ -Peak bei  $m/z$  286 zu erkennen. Zusätzlich hat sich ein Isopropanoladdukt mit der Masse 346 gebildet. Bei  $m/z$  571 liegt das für ein Hydromorphondimer erwartete  $[\text{Hydromorphon}_2+\text{H}]^+$ -Signal. Hydromorphon ist demnach -wie Morphin- in der Lage Dimere zu bilden.

Die Massenspektren der Abbildung 37 zeigen das Hippurat (37a) und das 2-Methoxybenzoat (37b). Deutlich sind jeweils die Peaks der freien Base bei  $m/z$

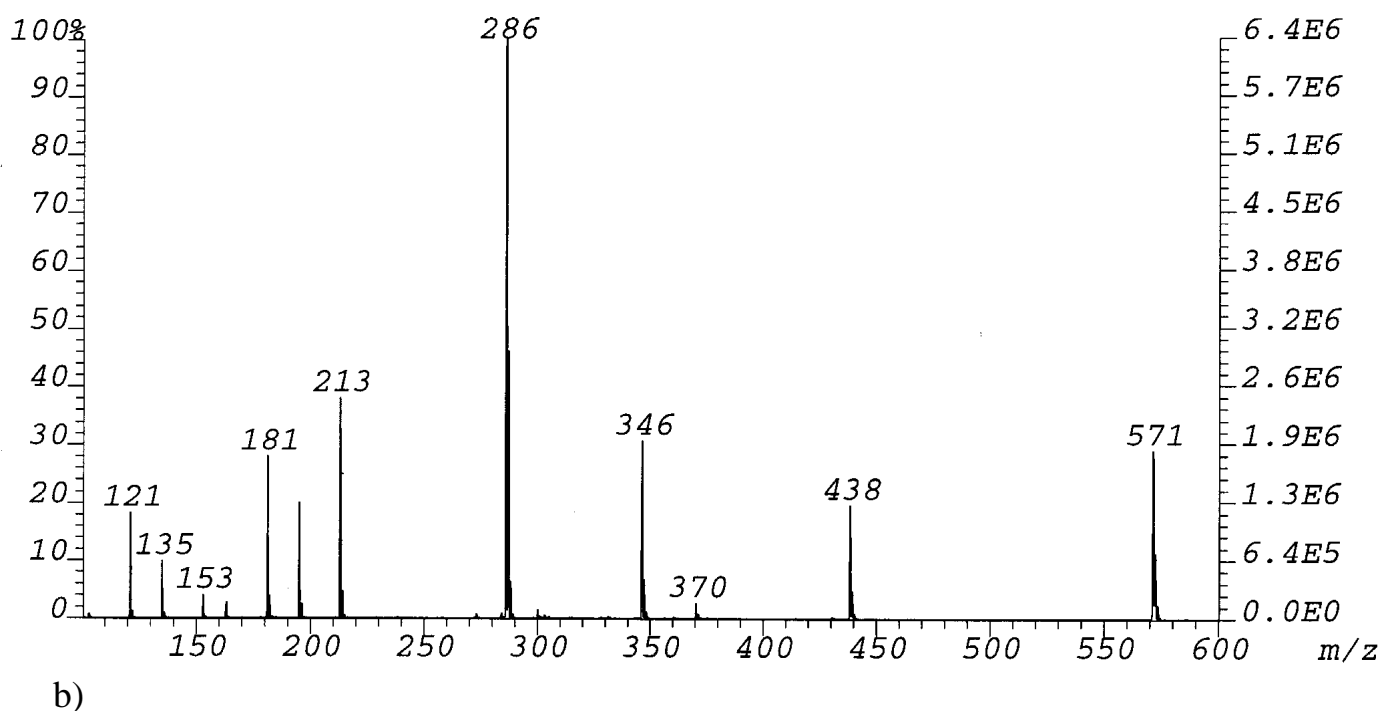
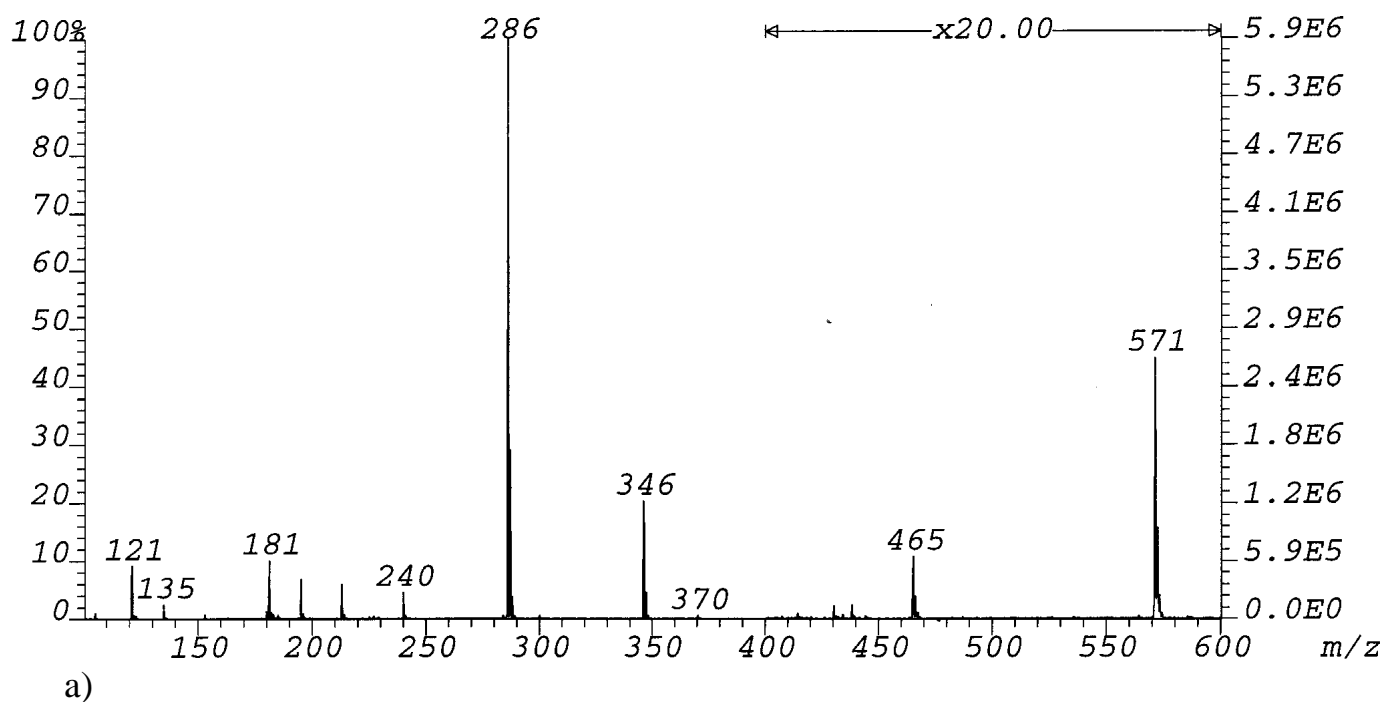


Abb.37: APCI-Massenspektren von Hydromorphonium-2-methoxybenzoat (37a) und Hydromorphoniumhippurat (37b); Isopropanol; C/S= 10%/10%

286, des Isopropanoladduktes bei  $m/z$  346 und des Hydromorphondimers bei  $m/z$  571 zu erkennen.

Die Spektren 36a und 36b zeigen die für die Ionenpaare zu erwartenden Signale: [Hydromorphon+Hippursäure+H]<sup>+</sup>-(Hippurat  $m/z$  465) und [Hydromorphon+2-Methoxybenzoesäure+H]<sup>+</sup>-(2-Methoxybenzoat  $m/z$  438). Wie beim Morphin bilden sich also detektierbare Ionenpaare, die eine Permeation im U-Rohr-Modell erleichtern. Bereits bei der hier angelegten C/S-Spannung von 10%/10% erscheinen in beiden Spektren Fragmentierungssignale im Bereich von  $m/z$  121 bis 240. Nach Erhöhung der C/S-Spannung waren die Komplexe nicht mehr detektierbar. Im folgenden Kapitel sollten die Ionenpaare Dampfdruckosmometrisch untersucht werden.

### 12.4 Dampfdruckosmometrische Untersuchungen von Hydromorphoniumsalz-Ionenpaaren

Um sterische Besonderheiten aufzuspüren wurden in gleicher Weise wie bei Morphin die Osmolalitätserniedrigungen der Hydromorphoniumsalzlösungen bestimmt und mit den  $pK_s$ -Werten der freien Säuren verglichen. Neben der Isopropanolreihe ist zur Vollständigkeit die Chloroformreihe in der Tabelle 15 mit aufgeführt.

Säure	$pK_s$ -Wert	[DIGIT] der Hydromorphonium- salzlösung Isopropanol	[DIGIT] der Hydromorphonium- salzlösung Chloroform
Phenoxyessigsäure	3,97	98 (1) [1]	46,8 (1) [1]
Nicotinsäure	4,54	104 (3)	/
2-Methoxybenzoesäure	5,52	103 (2) [2]	92 (5) [5]
Benzoesäure	5,76	107 (4) [3]	73,5 (2) [2]
Sebacinsäure- monomethylester	5,97	114 (5) [4]	85,5 (4) [4]
4-Hydroxybenzoesäure	6,06	114,5 (6)	/
Caprinsäure	6,41	115,5 (7) [5]	85 (3) [3]

Tab. 15: Vergleich gemessener Osmometer-[DIGITS] von Hydromorphoniumsalzlösungen in zwei Lösungsmitteln mit den in Kapitel 7 gemessenen  $pK_s$ -Werten. In den runden Klammern ist die Rangfolge der Osmolalitätserniedrigung für das jeweilige Lösungsmittel angegeben, in den eckigen Klammern die Rangfolge der Osmolalitätserniedrigung für Salze, die in beiden Lösungsmitteln gemessen wurden.

Insgesamt liegen die Osmolalitätswerte der Isopropanol-Reihe zwischen zwölf und 28 [DIGIT] über den entsprechenden Morphiniumsalzwerten, die der Chloroform-Reihe um zwei bis sieben [DIGIT].

In der Isopropanol-Reihe entspricht die Rangfolge der Osmolalitätserniedrigung bis auf eine Ausnahme den ansteigenden  $pK_s$ -Werten der freien Säuren. So liegt trotz kleinerem  $pK_s$ -Wertes die Nicotinatlösung in der Osmolalitätsrangfolge ein [DIGIT] vor der des 2-Methoxybenzoats. Die Werte differieren jedoch um weniger als ein Prozent. Im Gegensatz zu den untersuchten Morphiniumsalzen korrelieren hier die Osmolalitätserniedrigungen der Isopropanolreihe bis auf eine Ausnahme mit den  $pK_s$  Werten. Die sterische Einflußnahme der Säurereste auf die Rangfolge der Assoziierungsneigung ist hier geringer als beim Morphin. Daher wurde im nächsten Kapitel ein Hydromorphonium-Ionenpaar  $^1H$  NMR-spektroskopisch in einem aprotischen Lösungsmittel (Deuterochloroform) untersucht.

### *12.5 <sup>1</sup>H NMR-Spektroskopische Untersuchung des Hydromorphonium-phenoxyacetat Ionenpaares*

Wieder wurden zunächst <sup>1</sup>H NMR-Spektren der äquimolar in Deuteriochloroform gelösten Partner Hydromorphon und Phenoxyessigsäure separat aufgenommen. Im Hydromorphon-Base Spektrum sind im Vergleich zum Morphinspektrum die Resonanzsignale der Protonen am C7 bzw C8 aufgrund der hydrierten Doppelbindung nicht mehr bei 5,2 bzw 6,6 ppm zu finden. Stattdessen erscheinen 4 neue Methylenprotonensignale im Bereich von 1,2 ppm bis 2,4 ppm.

Anschließend wurde das <sup>1</sup>H NMR-Spektrum einer Hydromorphonium-phenoxyacetatlösung gleicher Konzentration aufgenommen. Eine zuvor vermessene Hydromorphoniumformiatlösung ermöglichte es, den entschirmenden Effekt der Basenprotonierung bei einem hohen Protonierungsgrad und ohne Beeinflussung durch einen größeren Säurerest wie z.B. eine Arylgruppe zu beobachten.

Die <sup>1</sup>H NMR-Spektren der Abbildung 38 zeigen die Hydromorphon-Base und das Hydromorphoniumphenoxyacetat. Es stellte sich heraus, daß beim Hydromorphoniumphenoxyacetat ein Protonierungsgrad von 80% in Relation zu Formiat vorliegt. In der zugehörigen Tabelle 16 sind neben den, für einen dem Formiat entsprechenden Protonierungsgrad berechneten, chemischen Verschiebungen des Phenoxyacetats die des Hydromorphoniumformiats mit aufgeführt.

Bei einigen Protonen zeigen sich Differenzen der chemischen Verschiebungen zwischen dem Formiat und dem Phenoxyacetat bei gleichem Protonierungsgrad. So sind die Signale der Protonen 16e, 14, 9 sowie der Methylgruppe C-17 und eines Protons am C-8 weiter zu tiefem Feld hin verschoben. Dies läßt darauf schließen, daß der Aromat der Phenoxyessigsäure mit dem entschirmenden Teil seines Anisotropiekegels im Mittel unterhalb des Cyclohexenringes angeordnet ist. Die Hochfeldverschiebung der Signale C-1 und C-10c im

Phenoxyacetatspektrum deutet darauf hin, daß der Aromat eines weiteren Hydromorphoniumphenoxyacetat-Ionenpaars mit dem abschirmenden Teil seines Anisotropiekegels im Mittel auf diesen Molekülteil gerichtet ist. Eine gegenseitige Beeinflussung der Assoziierungspartner bei der Ionenpaarbildung ist also möglich und kann für das unterschiedliche Assoziierungsverhalten der Salzlösungen verantwortlich sein.



## Theoretischer Teil

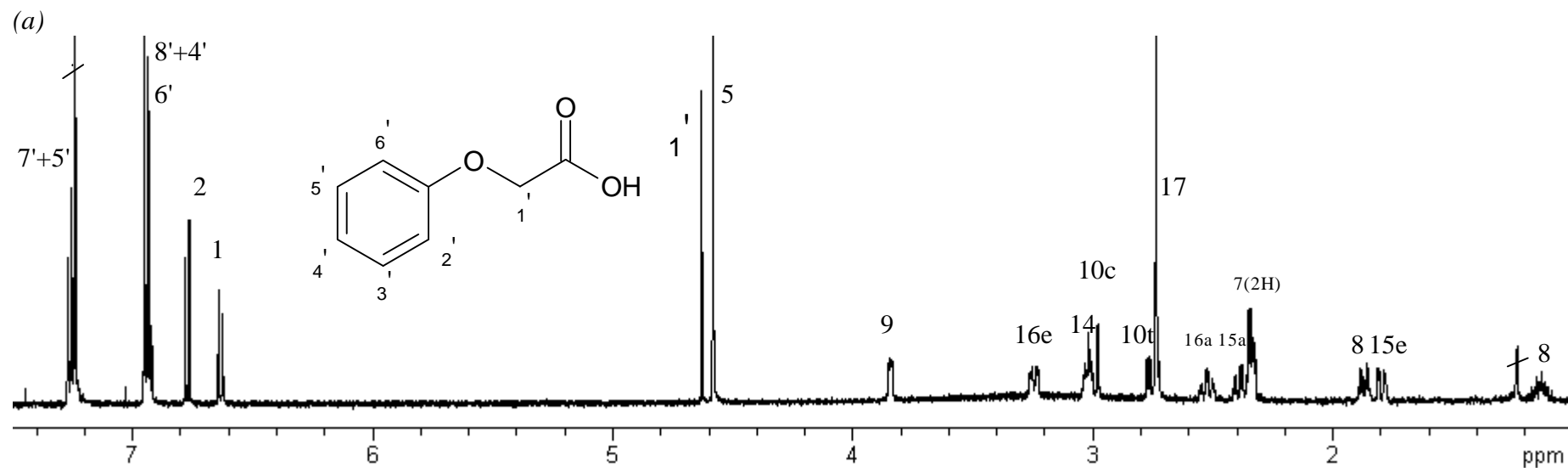
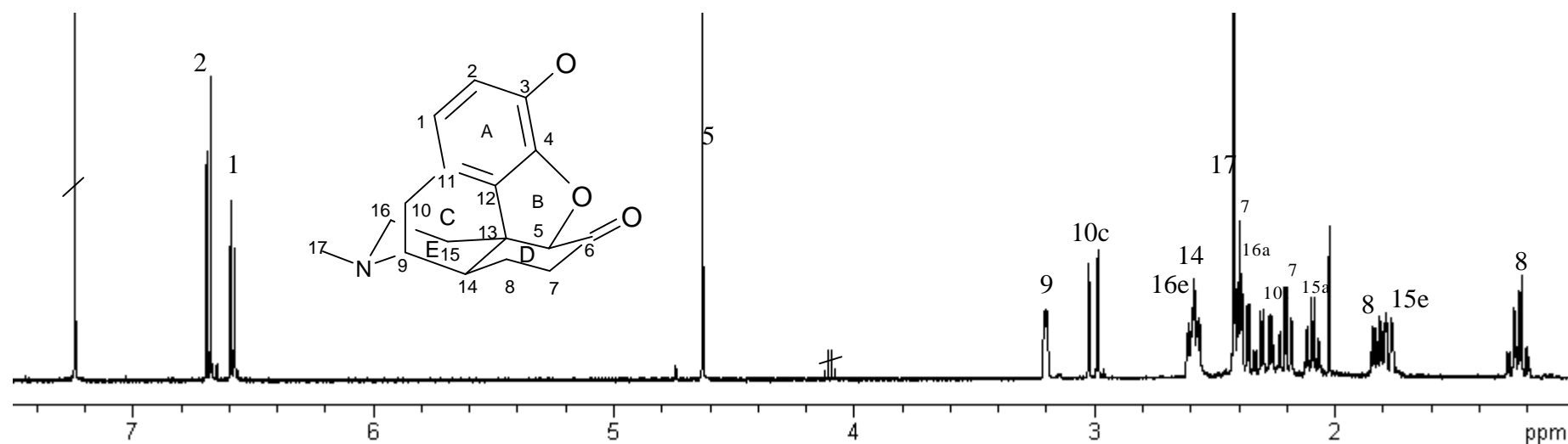


Abb.38: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum, 500 MHz; in CDCl<sub>3</sub> von: a) Hydromorphon-Base und b) Hydromorphoniumphenoxyacetat

## Theoretischer Teil

Kohlenstoff/ Signal-Nr.:	2	1	5	9	14	10c	16e	17	16a	10t	7	8	15a	15e
Chem.Ver- schiebung(ppm): Hydromorphon-Base	6,69	6,58	4,63	3,21	2,58	3,0	2,59	2,42	2,39	2,28	2,21 2,36	1,82 1,24	2,09	1,77
Chem.Ver- schiebung(ppm): Hydromorphonium- formiat	6,78	6,66	4,71	3,78	3,06	3,04	3,19	2,72	2,56	2,75	2,43 2,43	1,97 1,11	2,43	1,89
Chem.Ver- schiebung(ppm): Hydromorphonium- phenoxyacetat	6,77	6,34	4,63	3,84	3,02	2,75	3,26	2,73	2,52	2,75	2,34 2,34	1,87 1,13	2,34	1,87
Chem.Ver- schiebung(ppm): Hydromorphonium- phenoxyacetat (berechnet)	6,79	6,24	4,63	4,03	3,16	2,67	3,47	2,83	2,56	2,90	2,38 2,39	1,88 1,38	2,42	1,90
$\Delta$ -ppm: Base- Formiat	0,09	0,08	0,08	0,57	0,48	0,04	0,58	0,3	0,17	0,47	0,22 0,07	0,15 -0,13	0,34	0,12
$\Delta$ -ppm: Base- Phenoxyacetat (berechnet)	0,10	-0,34	0	0,82	0,58	-0,33	0,88	0,41	0,17	0,62	0,17 0,03	0,66 0,14	0,33	0,13
$\Delta$ -ppm: Formiat- Phenoxyacetat (berechnet)	0,01	-0,42	-0,08	0,25	0,1	-0,37	0,28	0,11	0	0,15	-0,05 -0,04	-0,09 0,27	-0,01	0,01

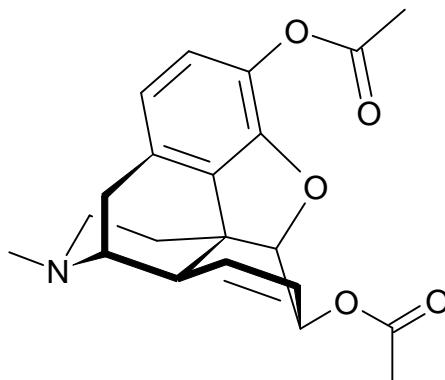
Tab.16: Chemische Verschiebungen (ppm) der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren; 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , von: Hydromorphon-Base; Hydromorphoniumformiat und Hydromorphoniumphenoxyacetat, sowie die berechneten chemischen Verschiebungen des Hydromorphoniumphenoxyacetats bei gleichem Protonierungsgrad wie Hydromorphoniumformiat in Deuteriochloroform

### 13. Untersuchung der Hautpermeabilität von Diamorphin und dessen organischer Säureadditionssalze sowie deren Charakterisierung

#### 13.1 Chemische und pharmakologische Eigenschaften des Diamorphins

Diamorphin (Heroin, Diacetylmorphin) (**44**) gehört in die Gruppe der partialsynthetisch hergestellten Morphinderivate, wie z.B. Hydromorphon (**43**) oder Buprenorphin (**2**) und besitzt somit auch die typischen Opiatwirkungen.

Aus Morphin wird es durch Acetylierung der beiden Hydroxylgruppen mit Acetanhydrid gewonnen<sup>68)</sup>.



Diamorphin (Heroin) (**44**)

Die Acetylierung hat eine Steigerung der Lipophilie im Vergleich zu Morphin zur Folge. (Der berechnete Verteilungskoeffizient  $\log p$  beträgt für Heroin 4,46, für Buprenorphin 4,2 und für Morphin 0,72). Dadurch passiert die Substanz schneller durch die Blut-Hirn Schranke. Der damit verbundene, sofortige zentrale Wirkungseintritt, besonders der Euphorie, erhöht das Suchtpotential des Heroins<sup>18)</sup>.

### *13.2 Therapie der Opiatsucht mit diamorphinhaltigen, transdermalen therapeutischen Systemen*

Zu therapeutischen Zwecken werden zur Zeit Morphin, Hydromorphon und Buprenorphin zur Bekämpfung starker und stärkster Schmerzzustände eingesetzt; Codein, ein teilmethyliertes Morphinderivat, wird aufgrund seiner stärker antitussiven Wirkung bei starkem Hustenreiz angewandt.

Anfang des Jahrhunderts wurde auch Heroin zur Behandlung von Husten verabreicht <sup>69)</sup>.

Die analgetische Wirkung des Heroins ist im Vergleich zum Morphin, das als das klassische zentral wirkende Analgetikum gilt, 3fach stärker<sup>8)</sup>. Die transdermale Applikation des Heroins ist aus zwei Gründen von Interesse. Einerseits ist ähnlich, dem Hydromorphon, aufgrund der stärkeren analgetischen Wirkung, eine geringere Menge an penetriertem Wirkstoff für einen pharmakologischen Effekt erforderlich, andererseits ermöglicht die kontinuierliche Freigabe des Wirkstoffs eine kontrollierte Aufnahme, wie sie in der Substitutionstherapie angestrebt wird. Die zur Zeit in Deutschland durchgeführten Substitutionsprogramme zur Behandlung der Heroinsucht beinhalten eine kontrollierte Abgabe des vollsynthetischen Opioidanalgetikums Levomethadon (**3**) an Heroinabhängige. Dieses ist jedoch in der Therapie dem Heroin selbst bei intravenöser Applikation unterlegen, wie der seit 1994 in der Schweiz laufende und wissenschaftlich ausgewertete Versuch zur staatlich kontrollierten Heroinabgabe gezeigt hat <sup>70)</sup>.

Dort wurde an 969 ausgewählte Heroinsüchtige, deren Krankengeschichte bereits mehrere erfolglose Therapieversuche und gravierende, primär oder sekundär aus der Heroinsucht resultierende gesundheitliche Probleme aufwies, Heroin zur intravenösen Applikation oder zur Aufnahme über die Lunge mittels Zigarettenrauch kontrolliert abgegeben.

Die verabreichte Dosis konnte nach anfänglichem Anstieg (bedingt durch die beabsichtigt sehr geringe Anfangskonzentrationen), ab dem 6. Monat konstant gehalten, z.T. auch leicht gesenkt werden.

Deutliche Verbesserungen an deren Gesundheitszustand erzielt man durch staatlich kontrollierte Verabreichung von Heroin an Heroinsüchtige. Auch wird ein signifikanter Rückgang der Beschaffungskriminalität durch Heroinsüchtige beobachtet. Der gesamtwirtschaftliche Nutzen betrug in der Schweiz durch Rückgang der Beschaffungskriminalität 96 Franken pro Person und Tag. Stand der Technik ist zur Zeit bei der Verabreichung von Heroin lediglich die intravenöse Injektion bzw. die Aufnahme mit dem Zigarettenrauch.

Auch die nasale Aufnahme, ähnlich der Cocainaufnahme über die Nasenschleimhäute, wird bei Heroinmißbrauch praktiziert. Jedoch sind diese Applikationsformen nicht dazu geeignet, einen konstanten Plasmaspiegel des Wirkstoffs herbeizuführen.

Pharmazeutische Systeme zur kontrollierten Abgabe von Heroin bei Heroinsucht sind nicht beschrieben.

Für Hydromorphon ist ein pharmazeutisches System zur kontrollierten Freisetzung in der Therapie bei Drogensucht beschrieben <sup>71)</sup>. Jedoch muß dieses zunächst unter die Haut implantiert werden. Ebenfalls bekannt sind enhancerhaltige, transdermale therapeutische Systeme mit Hydromorphon als Wirkstoff<sup>31)</sup>.

Für den Wirkstoff Buprenorphin (2) werden zwei transdermale therapeutische Systeme zur Behandlung von Suchterkrankungen und Schmerzzuständen erwähnt. Aufgrund der hohen Lipophilie des Wirkstoffs besteht jedoch die Gefahr, daß sich Buprenorphin in der lipophilen Phase des Stratum corneum anreichert und nicht in ausreichendem Maße in das Kapillarsystem aufgenommen wird. Eine ausreichende Wirkstoffpenetration gelingt mittels einer speziellen polyacrylathaltigen Klebeschicht<sup>72)</sup> bzw. als Säureadditionssalz<sup>73)</sup>.

### *13.3. Untersuchung der Hautpermeationseigenschaften unterschiedlicher Diamorphiniumsalze*

Da Heroin einen ähnlich großen Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten wie Buprenorphin aufweist, ist bei der transdermalen Applikation der Base mit ähnlichen Wirkstoffakkumulationen im Stratum corneum zu rechnen. Es wurde untersucht, ob Heroin wie Morphin in der Lage ist, Ionenpaare mit organischen Carbonsäuren zu bilden, die eine ausreichende Wirkstoffpermeation und Resorption gewährleisten. Hierzu wurden vier heroinhaltige Tylose-Wasser Zubereitungen hergestellt, die neben der reinen Base jeweils ein organisches Säureadditionssalz enthielten. Diese Zubereitungen wurden in der bereits bei Morphin beschriebenen Weise mit Meerschweinchenhaut auf ihr Heroinpermeationsvermögen untersucht; die Ergebnisse sind in Abbildung 39 und Tabelle 17 zusammengefaßt.

Wie aus Abbildung 39 ersichtlich, permeiert aus Tylose/Wasser die geringste Menge Heroin bei der Verwendung der freien Base durch die Haut. Dieser Wert konnte mit Heroiniumbenzoat um ca 40% gesteigert werden. Eine Verdopplung der Heroinkonzentration im Akzeptormedium gelang mit dem Heroiniummonomethylsebacat. Wie bereits bei Morphin bzw. Hydromorphon gezeigt, ist eine Steigerung der Hautpermeation durch Salzbildung auch für Heroin möglich. Im Gegensatz zum Morphin und Hydromorphon wird hier jedoch die Permeation durch das Monomethylsebacat, das einen Alkylrest besitzt, stärker erhöht, als durch das Benzoat mit dem Arylrest.

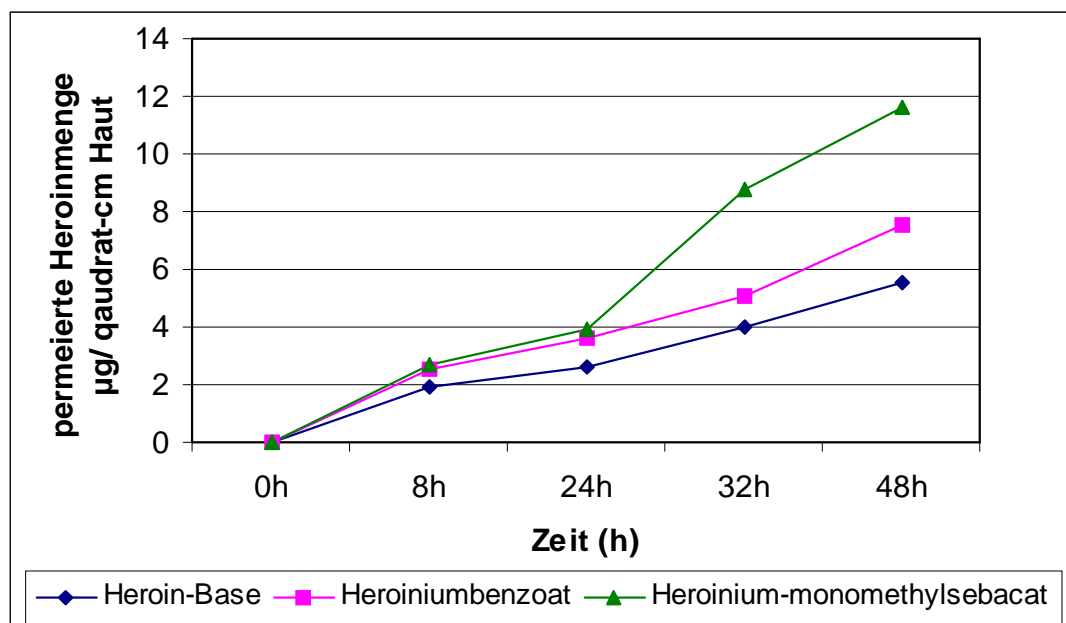


Abb.39: Hautpermeation des Heroins und seiner Salze durch Meerschweinchenhaut aus Tylose/Wasser-Medium

Zeit der Probennahme	Heroin-Base	Heroinium-Benzoat	Heroinium-monomethylsebacat
8h	1,92 µg/cm <sup>2</sup>	2,56µg/cm <sup>2</sup>	2,68µg/cm <sup>2</sup>
24h	2,58µg/cm <sup>2</sup>	3,58µg/cm <sup>2</sup>	3,91µg/cm <sup>2</sup>
32h	3,99µg/cm <sup>2</sup>	5,06µg/cm <sup>2</sup>	8,75µg/cm <sup>2</sup>
48h	5,54µg/cm <sup>2</sup>	7,53µg/cm <sup>2</sup>	11,6µg/cm <sup>2</sup>

Tab.17: Kumulierte Werte der permeierten Heroinmenge aus Tylose/Wasser-Medium (µg/cm<sup>2</sup>)

Durch die Verwendung eines wasserfreien Donorvehikels (z.B. Olivenöl) könnte sich die Permeationsmenge noch steigern lassen. Eine rasche Abnahme des Diffusionsdrucks, bedingt durch den hydrolytischen Abbau des Heroins zu Morphin oder Monoacetylmorphin durch Deacetylierung sollte hierdurch vermieden werden. Diese Instabilität im wässrigen Milieu läßt Permeationsversuche am U-Rohr-Modell nicht zu. Sie ist außerdem bei der Herstellung von pharmazeutischen Formulierungen zu berücksichtigen.

Das Permeationsvermögen von Heroin läßt sich demnach durch die Bildung organischer Carbonsäuresalze steigern. Ob sich hierbei ebenfalls stabile, detektierbare Ionenpaare bilden, sollte mit Hilfe der Massenspektrometrie untersucht werden.

### 13.4 Massenspektrometrische Untersuchungen der Heroiniumsalzionenpaare

Eine äquimolare Lösung aus Base und der jeweiligen Säure wurde in die APCI-Ionenquelle injiziert. Dabei wurde auch untersucht, ob die Heroin-Base ähnlich Morphin und Hydromorphon Dimere und Lösungsmitteladdukte bildet.

Das Massenspektrum des Heroinium-2-methoxybenzoats (Abb.40) zeigt neben dem  $[\text{Heroin}+\text{H}]^+$ -Signal bei  $m/z$  370 das Isopropanoladdukt ( $m/z$ : 430) sowie das Heroin-Dimer bei  $m/z$  739. Deutlich ist bei  $m/z$  522 der  $[\text{Heroin}+2\text{-Methoxybenzoesäure H}]^+$ -Peak des Ionenpaares zu sehen. Im Bereich von  $m/z$  110 bis 213 sind einige Fragmentierungssignale zu erkennen

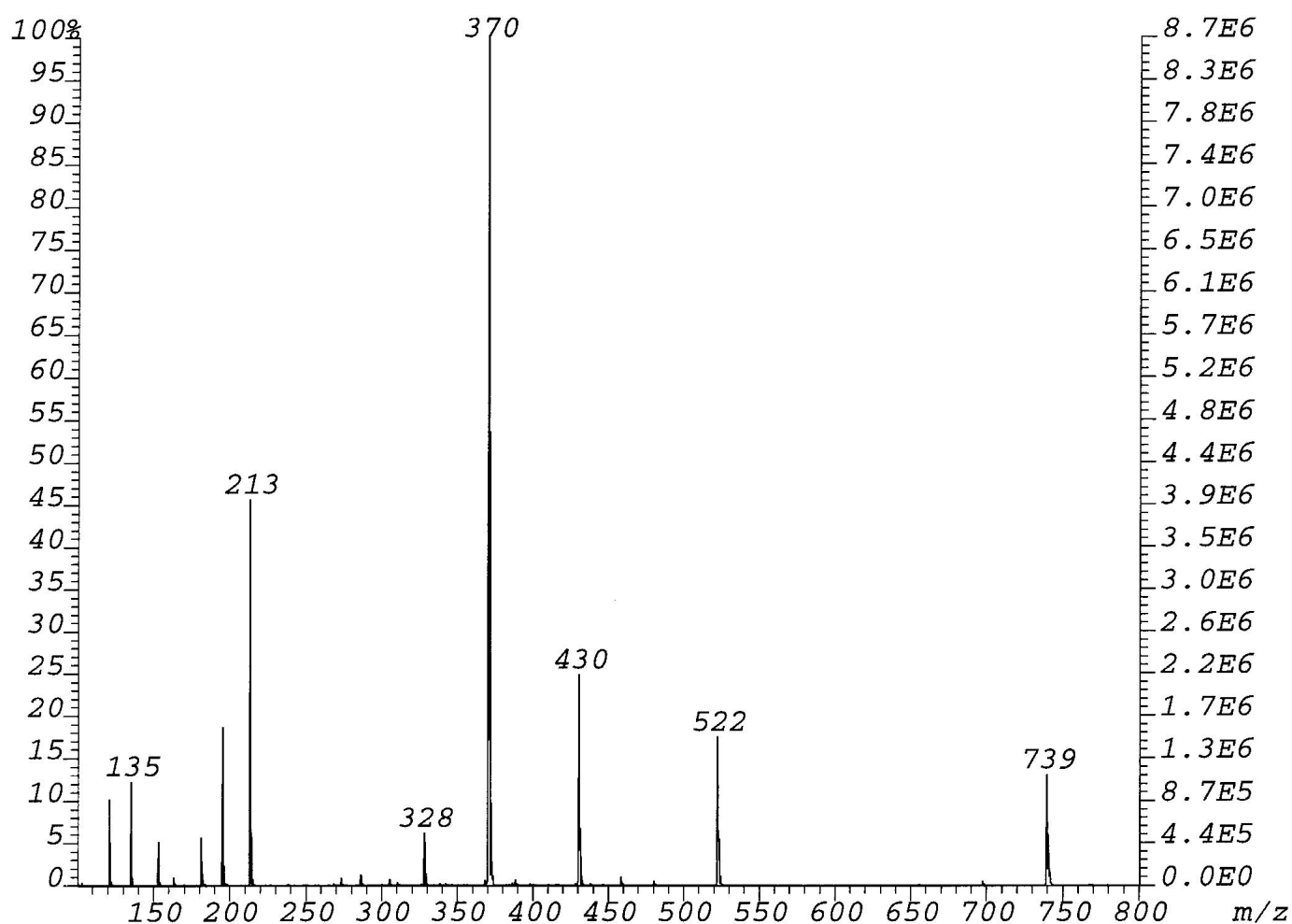


Abb.40:APCI-Massenspektrum von Heroinium-2-methoxybenzoat; Isopropanol  
C/S= 10%/10%



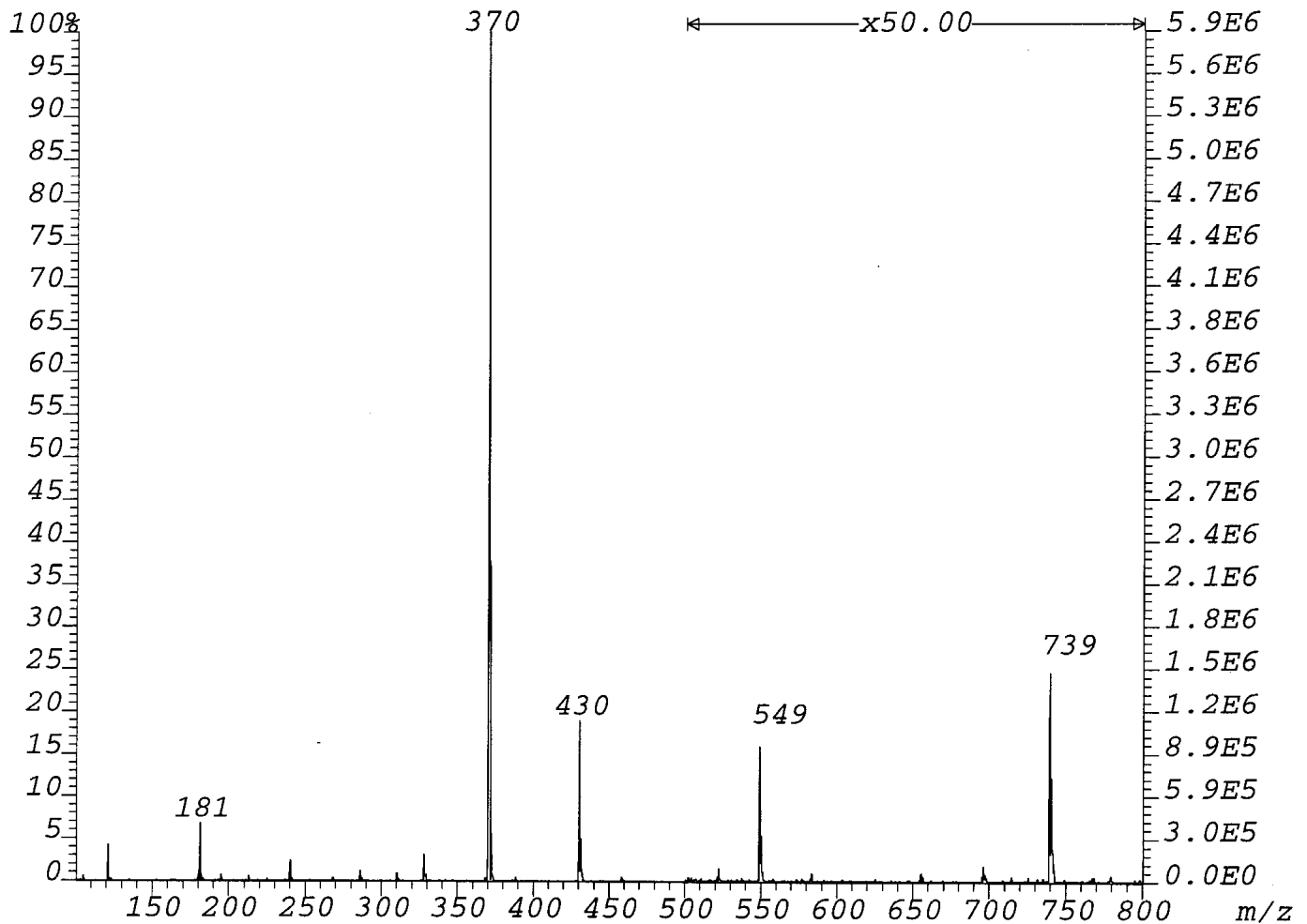


Abb.41: APCI-Massenspektrum von Heroiniumhippurat; Isopropanol; C/S= 10%/10%

Auch im Massenspektrum des Heroiniumhippurats (Abb.41) ist unter 50-facher Verstärkung neben dem  $[\text{Heroin}+\text{Hippursäure}+\text{H}]^+$ -Signal bei  $m/z$  549 das Signal des Heroindimers zu sehen ( $m/z$ : 739). Weiterhin ist das Heroin-Isopropanol Addukt bei  $m/z$  430 zu erkennen. Heroin bildet demnach wie Morphin und Hydromorphon mit verschiedenen organischen Carbonsäuren stabile, massenspektrometrisch detektierbare Ionenpaare. Die erhöhte Hautpermeation von Heroiniumsalzen, im Vergleich zur Base, ist auf diese Ionenpaarbildung zurückzuführen.

#### 14. Zusammenfassung und Ausblick

Durch das neue, zum Patent angemeldete Verfahren<sup>74)</sup> der transdermalen Applikation von Opiaten über Salzbildung wird eine sinnvolle Alternative zu den bisherigen Möglichkeiten der Morphintherapie bereitgestellt. Die nachgewiesene Bildung von stabilen Ionenpaaren bewirkt eine Veränderung der für die Hautpermeation wichtigen physikochemischen Eigenschaften.

Eine genaue Voraussage des Permeationsvermögens eines Opiatsalz-Ionenpaares ist aufgrund der gegenseitigen Beeinflussungen der Assoziationspartner, wie beispielsweise Maskierung funktioneller Gruppen oder Protonierungs- bzw. Deprotonierungsreaktionen, anhand des Verteilungskoeffizienten bzw. des pKs-Wertes der verwendeten Säure nicht möglich.

Es zeigte sich, daß Morphiniumsalze von Carbonsäuren mit Arylresten eine höhere Morphinkonzentration im Akzeptormedium ergeben, als die von Säuren mit Alkylresten.

Die Solvation der Ionenpaare im Pflaster spielt bei der Hautpermeation eine wichtige Rolle. Im Gegensatz zu Salzen anorganischer Säuren werden Morphiniumsalze organischer Säuren in aprotischen, organischen Lösungsmitteln als Ionenpaare solvatisiert. So können diese Ionenpaare leichter in den lipophilen Teil des Stratum corneum diffundieren (dies begünstigt die Hautpermeation), als es bei hydrophil solvatisierten Ionen, beispielsweise Morphiniumsalzen anorganischer Säuren der Fall ist. Diese bilden im hydrophilen keine Ionenpaare und sind in organischen, aprotischen Lösungsmitteln nicht löslich.

Sobald die Ionenpaare der Morphiniumsalze organischer Carbonsäuren aber in wässriges Medium gelangen –z.B. Blutkapillaren–, werden sie aufgrund ihrer ionischen Eigenschaft ebenfalls gelöst, solvatisiert und abtransportiert. Damit wird gleichzeitig das Problem der Kumulierung lipophiler Substanzen im Stratum corneum vermieden. Die Hautpermeation von Morphiniumsalzen

organischer Carbonsäuren ist daher bei Verwendung lipophiler, wasserfreier Donormedien noch weiter steigerungsfähig. Massenspektrometrische Untersuchungen mit dem APCI-Verfahren sind geeignet, die für eine gesteigerte Hautpermeation erforderliche Ionenpaarbildung nachzuweisen. Dadurch besteht die Möglichkeit, bereits vor Hautpermeationsuntersuchungen die Ionenpaarbildung mit geeigneten Carbonsäuren zu optimieren. Zur Detektion muß jedoch bei Anwendung des APCI-Ionisierungs- und Probenzuführungsverfahrens eine ausreichende Protonenaffinität des Komplexes vorliegen.

Die genauere Charakterisierung der Ionenpaare gelingt mit der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie und der Dampfdruckosmometrie. Während mit der Dampfdruckosmometrie der Assoziierungsgrad lediglich summarisch erfaßt wird, läßt sich anhand der unterschiedlichen Protonenresonanzsignalverschiebungen der Protonierungsgrad der Basen im Salz erfassen.

Die Erhöhung der Hautpermeationsrate von Morphin durch Salzbildung ist auch auf andere Opiate wie z.B. Diamorphin übertragbar. Der Nachweis der Assoziierung anhand der vorgestellten analytischen Methoden gelingt auch bei diesen Substanzen.

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse erscheint es sinnvoll, für andere Arzneistoffe, z.B. Antiasthmatica wie Salbutamol, auf diesem Weg nach einer transdermalen Applikationsmöglichkeit zu suchen. Unerwünschte, durch rhythmische Einnahme hervorgerufene Plasmaspiegelschwankungen der Arzneistoffkonzentration könnten durch die kontrollierte und kontinuierliche transdermale Aufnahme vermieden werden.

## **15. Hautpermeationsuntersuchungen der Morphiniumsalze aus Tylose-Wasser-Vehikel durch Meerschweinchenhaut**

### *15.1 Allgemeine Vorschrift zur Herstellung der Zubereitung zum Auftrag auf die Applikationshilfe*

Das Vehikel besteht aus einer 3%igen Methylhydroxyethylcellulose (Tylose)-Lösung in Wasser. Zur Herstellung werden 3g Tylose in 100ml destilliertem Wasser suspendiert und 3 Stunden gerührt. Anschließend wird eine genaue Menge Wirkstoff, 2% (Gewicht) Base entsprechend, 12 Stunden in das Vehikel eingerührt. Die Applikationshilfe besteht aus einer Okklusionsfolie mit 3cm Durchmesser, die am Rand mit einem 8mm breiten Klebering, zur besseren Haftung auf der Haut, versehen ist. Innerhalb dieses Kleberings befindet sich eine 2,54 cm<sup>2</sup> große Vliesschicht, die das Wirkstoffreservoir bildet. Nach Verrühren des Wirkstoffs mit dem Vehikel werden 100 mg (+/- max. 3%) der Zubereitung auf das Vlies aufgetragen. Die mit Wirkstoff beschickte Applikationshilfe wird um 180° gedreht und auf die trockene Hautoberfläche geklebt. Zur besseren Verbindung wird der Applikationshilfe-Haut Verbund 5 Minuten lang mit einem 200g-Gewicht beschwert.

### *15.2 Vorbereitung der Diffusionszelle und Einspannen des Applikationshilfe-Haut-Stückes*

Die Diffusionszellen befinden sich während des Versuches in einem bereits auf 37 °C vortemperierten Wasserbad, unter dem eine elektromagnetische Rührplatte angebracht ist. Der Haut-Applikationshilfe Verbund wird mit der Applikationshilfe nach oben vorsichtig in die Diffusionszelle eingespannt. Anschließend wird die Diffusionszelle einmal mit 23 ml Akzeptorlösung, bestehend aus 0,9% NaCl-Lösung, die zu Konservierungszwecken mit 0,1% NaN<sub>3</sub> versetzt ist, gespült und gleich darauf erneut mit 23 ml dieser Lösung beschickt. Die Akzeptorlösung wird über den gesamten Versuchszeitraum gerührt.

*15.3 Probenentnahme und quantitative Auswertung:*

Jeweils nach 7,5 Stunden, 24 Stunden, 30 Stunden und 48 Stunden wurde das Akzeptormedium komplett ausgetauscht. Die Proben wurden gesammelt und nach Beendigung des Permeationsversuches per HPLC mit UV-Photometrischer Detektion quantitativ ausgewertet. Pro Substanz und Durchgang werden 2-3 Diffusionszellen beschickt und ausgewertet.

*15.4 Liste der eingesetzten Materialien und Geräte:*

-Hautmaterial: Nude-Guinea Pig Rücken

Lieferant: Institut IBR-Walsrode

Chargen-Bez.: n.g.p. (# 20-05-0455/00-95)

-Applikationshilfe: Okklusivfolie: Lohmann Rostaphan RN 15-Folie,

Schichtdicke 15µm, PET (Polyethylenterephthalsäure-  
ethylester)

Vliesschicht: Lohmann Paratex-Cotton

Klebeschicht: Lohmann Duplokoll-Polyacrylatkleber

-Vehikel: Methylhydroxyethylcellulose (Tylose) MH 300 P (Hoechst)

-Akzeptormedium: Natriumazid  $\text{NaN}_3$  (Merck) 0,01g

Natriumchlorid  $\text{NaCl}$  (Merck) 0,9 g

dest. $\text{H}_2\text{O}$  ad 100,0 g

-Wasserbad: Heizung und Thermostat: Ika EH2

-Rührwerk: Rührplatte: Ikamac EOA 9

Rührplattencontroller: Ika ES 5 Einstellung: Stufe 4 (650 U/min)

HPLC-Auswertung: Pumpe: Merck-Hitachi L6200

Autosampler: Merck/Hitachi 655A-40

(Einspritzmenge: 20µl)

Säule: Waters µ-Bondapak RP 8 150 x 3,8mm

Detektor: Merck/Hitachi L-4000 UV-Detektor

Mobile Phase: wässr. Ammoniumacetatlösung 0,05M 85%

Acetonitril: Merck LiChrosolv 15%

Detektionwellenlänge: 220nm

Referenz: 0,5 mg/ml Morphin-Base in mobiler Phase gelöst

Flußrate: 1ml/min

*15.5 Gemessene Einzelwerte: Permeierte Morphinmenge µg/cm<sup>2</sup> Haut:*

(HG: Hautgewicht; WP: Wechsellpunkt)

**Mittelwerte:**

Proben- bezeichnung	HG (mg)	1.WP 7,5h	2.WP 24h	3.WP 30h	4.WP 48h
Morphin-Base	1120	0,215	3,96	5,67	36,20
Morphin-Base	1380	0,446	6,73	7,51	38,30
		0,33	5,34	6,59	37,25

Tab.18

Proben- bezeichnung	HG (mg)	1.WP 7,5h	2.WP 24h	3.WP 30h	4.WP 48h
Mo.-nicotinat	1450	0,55	10,80	7,43	62,60
Mo.-nicotinat	1440	2,88	5,86	13,00	56,60
Mittelwerte		1,71	8,33	10,21	59,60

Tab.19

Proben- bezeichnung	HG (mg)	1.WP 7,5h	2.WP 24h	3.WP 30h	4.WP 48h
Mo.-benzoat	1410	10,51	73	54,71	143
Mo.-benzoat	940	3,60	14,86	14,14	78,10
Mittelwerte		7,05	43,63	34,40	157,90

Tab.20

Proben- bezeichnung	HG (mg)	1.WP 7,5h	2.WP 24h	3.WP 30h	4.WP 48h
Mo.-trimethylbenzoat	1260	6,78	26,10	18,90	78,60
Mo.-trimethylbenzoat	1180	0,95	12,80	13,80	67,80
Mittelwerte		3,86	19,45	16,35	73,20

Tab.21

Proben- bezeichnung	HG (mg)	1.WP 7,5h	2.WP 24h	3.WP 30h	4.WP 48h
Mo.-p-brombenzoat	1430	50,50	181	75,30	167
Mo.-p-brombenzoat	1600	73,30	182	74,40	145
Mo.-p-brombenzoat	1440	70	172	67,10	147
Mittelwerte		64,60	178	72,30	153

Tab.22

Proben- bezeichnung	HG (mg)	1.WP 7,5h	2.WP 24h	3.WP 30h	4.WP 48h
Mo.-p-aminobenzoat	1120	3,95	14,50	13,10	75,20
Mo.-p-aminobenzoat	1240	0,90	10,20	12,90	90,10
Mo.-p-aminobenzoat	1270	22,60	32,00	11,20	25,80
Mittelwerte		9,15	18,90	12,40	63,70

Tab.23

**Kumulierte Werte:**

Proben- bezeichnung	HG (mg)	1.WP 7,5h	2.WP 24h	3.WP 30h	4.WP 48h
Morphin-Base	1120	0,21	4,18	9,85	46
Morphin-Base	1380	0,45	7,18	14,70	53
Mittelwerte		0,33	5,68	12,75	49,50

Tab.24

Proben- bezeichnung	HG (mg)	1.WP 7,5h	2.WP 24h	3.WP 30h	4.WP 48h
Mo.-nicotinat	1450	0,55	11,35	18,77	81,37
Mo.-nicotinat	1440	2,88	8,74	20,27	78,37
Mittelwerte		1,71	10,04	20,27	79,87

Tab.25

Proben- bezeichnung	HG (mg)	1.WP 7,5h	2.WP 24h	3.WP 30h	4.WP 48h
Mo.-benzoat	1410	10,51	83,57	138,28	342,86
Mo.-benzoat	940	3,60	18,43	32,57	144,28
Mittelwerte		7,05	51	85,42	243

Tab.26

Proben- bezeichnung	HG (mg)	1.WP 7,5h	2.WP 24h	3.WP 30h	4.WP 48h
Mo.-trimethylbenzoat	1260	6,78	32,90	51,78	130,38
Mo.-trimethylbenzoat	1180	0,95	13,75	27,55	95,35
Mittelwerte		3,86	23,32	39,66	112,86

Tab.27



Proben- bezeichnung	HG (mg)	1.WP 7,5h	2.WP 24h	3.WP 30h	4.WP 48h
Mo.-p-aminobenzoat	1120	3,95	18,50	31,60	107
Mo.-p-aminobenzoat	1240	0,90	11,10	24	114
Mo.-p-aminobenzoat	1270	22,60	54,60	65,80	91,60
Mittelwerte		9,15	28	40,40	104

Tab.28

Proben- bezeichnung	HG (mg)	1.WP 7,5h	2.WP 24h	3.WP 30h	4.WP 48h
Mo.-p-brombenzoat	1430	50,50	232	307	474
Mo.-p-brombenzoat	1600	73,30	255	330	475
Mo.-p-brombenzoat	1440	70	242	309	456
Mittelwerte		64,60	243	315	468

Tab.29

## **16 U-Rohr Permeationsversuche mit Morphinium- und Hydro-Morphoniumsalzen**

### *16.1 Allgemeine Vorschrift*

Das U-Rohr besteht aus einem Glasrohr mit 26 mm Innendurchmesser. Der Schenkelabstand beträgt 56 mm. Die Schenkel haben eine Länge von 110 mm.

Das U-Rohr wird so auf einem Wasserbad befestigt, daß sich der gesamte Radius und die unteren 40 mm der Schenkel unter der Wasseroberfläche befinden. Das Wasserbad wird auf 37°C temperiert.

Das U-Rohr wird mit 53 ml  $\text{CHCl}_3$  (Merck: LiChrosolv), das zuvor 12 Stunden mit destilliertem Wasser gesättigt wurde, befüllt. 10ml destilliertes Wasser werden als Akzeptorphase in einen der beiden Schenkel auf die Chloroformphase gegeben. Der andere Schenkel wird mit einer Lösung von Morphiniumsalz (Hydromorphoniumsalz), genau 150 mg Base enthaltend, in 10 ml dest. Wasser befüllt. Das Wasserbad steht auf einer Ikamac EOA 9 Rührplatte. Der Rührplattencontroller Ika ES 5 wird auf Stufe 4 (650 U/min) eingestellt. Im U-Rohr befindet sich ein 5x10 mm großer Magnetrührfisch.

Die Probenentnahme erfolgt entweder nach 8, 24, 32 und 48 Stunden, oder nach 24 und 48 Stunden. Dazu werden jeweils 200 µl der wässrigen Akzeptorphase entnommen. Bei einem Teil der Salze wurden auch Proben der org. Phase entnommen und quantitativ ausgewertet.

Die quantitative Auswertung wird per HPLC mit photometrischer Detektion unter den aufgeführten Bedingungen durchgeführt:

- Pumpe/Controller: Waters 600E
- Detektor: Waters 991 PDA-Detektor
- Autosampler: Waters WISP 700 Satellite
- Säule: Merck RP Select B 300 4 mm
- mobile Phase: Acetonitril LiChrosolv, Merck 520 ml  $\text{H}_2\text{O}$ : 480 ml;  
Natriumdodecylsulfat: Merck: 500ml,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85%: Merck, 0,25 ml
- Injektionsvolumen: 10 µl

-Fluß: 1ml/min

-Auswertung:

-Detektionswellenlänge: 220

-Integrationssoftware: Waters 990

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den Tabellen 31 und 32 aufgeführt:

### 16.2 Tabellierte Morphin- und Hydromorphonkonzentrationen im Akzeptormedium

Hydromorphonium-salz	Phase	Gehalt Base: mg/ml	
		24h	48h
4-Aminobenzoat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	2,70	3,84
	CHCl <sub>3</sub>	0,15	0
2-Methoxybenzoat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	3,12	3,74
	CHCl <sub>3</sub>	1,08	0,49
Benzoat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	1,75	2,71
	CHCl <sub>3</sub>	0,78	0,65
4-Hydroxybenzoat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	0,13	0,22
	CHCl <sub>3</sub>	0	0
Caprinat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	0,09	0,08
	CHCl <sub>3</sub>	1,59	1,61
Hydrochlorid	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	0	0
	CHCl <sub>3</sub>	0	0
Hippurat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	1,32	2,55
	CHCl <sub>3</sub>	0	0
Monomethylsebacat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	0,08	0,38
	CHCl <sub>3</sub>	2,79	2,84
Nicotinat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	0,26	1,27
	CHCl <sub>3</sub>	0,01	0,012
Phenoxyacetat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	1,55	2,77
	CHCl <sub>3</sub>	0,08	0,028
Base	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	0	0,063
	CHCl <sub>3</sub>	2,37	2,66

Tab.30: Hydromorphonkonzentration in der wässrigen Akzeptorphase und der org.Membranphase des U-Rohr-Modells

Die folgenden Seiten zeigen Tabelle 31:

Morphinium-salz	Phase	Gehalt Säure: mg/ml				Gehalt Base: mg/ml			
		8h	24h	32h	48h	8h	24h	32h	48h
Acrylat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	/	/	/	0,10	0,29	0,45	0,73
	CHCl <sub>3</sub>	/	/	/	/	0,14	0,13	0,14	0,09
N-Acetyl-glycinat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	/	/	/	/	0,29	/	0,43
	CHCl <sub>3</sub>	/	/	/	/	/	0,17	/	0,14
Acetylsalicylat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	1,90	/	2,74	/	0,27	/	0,70
	CHCl <sub>3</sub>	/	0	/	1,02	/	0	/	0
4-Amino-benzoat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	1,72	/	3,68	/	0,59	/	1,71
	CHCl <sub>3</sub>	/	/	/	0,08	/	0,02	/	0,02
4-Amino-2-hydroxybenzoat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	0,71	/	2,90	/	0,47	/	0,68
	CHCl <sub>3</sub>	/	0,04	/	0,03	/	0,04	/	0,05
Anthracen-9-carbonat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	/	/	/	0,28	0,39	0,42	0,61
	CHCl <sub>3</sub>	/	/	/		/	/	/	/
Benzoat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	1,98	2,41	4,08	4,10	0,43	1,02	1,82	3,02
	CHCl <sub>3</sub>	/	/	/	/	/	/	/	/
4-Hydroxybenzoat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	4,62	4,62	2,80	0,23	0,24	0,35	0,46
	CHCl <sub>3</sub>	/	/	/	/	/	/	/	/
2,4,6-Trimethylbenzoat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	1,14	3,17	3,57	4,75	0,42	1,58	1,95	3,24
	CHCl <sub>3</sub>	/	/	/	/	/	/	/	/
4-Methyl-3-nitrobenzoat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	3,67	4,70	5,44	6,09	0,40	0,70	1,35	2,78
	CHCl <sub>3</sub>	/	/	/	/	/	/	/	/
2-Methyl-3-nitrobenzoat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	2,47	3,62	3,18	4,48	0,09	0,42	1,20	2,06
	CHCl <sub>3</sub>	/	/	/	/	/	/	/	/
4-Brombenzoat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	1,42	2,52	3,55	3,72	0,40	1,24	2,37	3,33
	CHCl <sub>3</sub>	/	/	/	/	/	/	/	/
4-tert-Butylbenzoat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	0,45	/	0,70	/	0,11	/	0,18
	CHCl <sub>3</sub>	/	/	/	/	/	/	/	/
2-Methoxybenzoat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	0,62	/	0,84	/	0,66	/	0,87
	CHCl <sub>3</sub>	/	0,93	/	0,88	/	0	/	0
Caprinat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	/	/	/	/	/	/	0,28
	CHCl <sub>3</sub>	/	/	/	/	/	0,18	/	0
Flufenamat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	0	/	0,23	/	0,72	/	0,75
	CHCl <sub>3</sub>	/	/	/	/	/	1,26	/	1,26
Flurbiprofenat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	/	/	/	/	0,82	/	0,80
	CHCl <sub>3</sub>	/	/	/		/	0,42	/	0,42

Morphinium-salz	Phase	Gehalt Säure: mg/ml				Gehalt Base: mg/ml			
		8h	24h	32h	48h	8h	24h	32h	48h
Formiat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	/	/	/	/	0,06	/	0,068
	CHCl <sub>3</sub>	/	/	/	/	/	0	/	0,074
Hippurat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	0,14	/	0,24	/	0,2	/	0,63
	CHCl <sub>3</sub>	/	/	/	0,01	/	0,03	/	0,03
Ibuprofenat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	/	/	/	0,32	0,59	0,70	0,79
	CHCl <sub>3</sub>	/	/	/	/	/	/	/	/
Indometacinat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	0,06	/	0,11	/	1,82	/	0,41
	CHCl <sub>3</sub>	/	0,19	/	0,07	/	0,36	/	0,32
Ketoprofenat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	0,93	/	1,02	/	1,07	/	1,16
	CHCl <sub>3</sub>	/	0,83	/	1,72	/	0,81	/	0,85
Ketorolacat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	2,18	/	2,40	/	0,82	/	0,80
	CHCl <sub>3</sub>	/	0,93	/	1	/	0,42	/	0,423
Liponat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	/	/	/	0,52	0,71	0,98	1,47
	CHCl <sub>3</sub>	/	/	/	/	0,46	0,13	0,48	0,55
Mefenamat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	/	/	/	0,38	0,53	0,55	0,71
	CHCl <sub>3</sub>	/	/	/	/	/	/	/	/
Monomethyl-sebacat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	/	/	/	0,32	0,65	0,75	1
	CHCl <sub>3</sub>	/	/	/	/	/	/	/	/
Monomethyl-azealat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	/	/	/	/	0,49	/	0,58
	CHCl <sub>3</sub>	/	/	/	/	/	0	/	0
Monoethyl-sebacat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	/	/	/	/	0,23	/	0,30
	CHCl <sub>3</sub>	/	/	/	/	/	0,01	/	0,002
Monoethyl-suberat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	/	/	/	/	0,60	/	0,71
	CHCl <sub>3</sub>	/	/	/	/	/	0	/	0,031
Nicotinat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	/	/	/	0,24	0,29	0,26	0,55
	CHCl <sub>3</sub>	/	/	/	/	/	/	/	/
Naproxenat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	0,56	/	0,59	/	0,95	/	1,02
	CHCl <sub>3</sub>	/	0,56	/	0,56	/	0,53	/	0,56
Nifluminat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	0,30		0,61		0,57		0,89
	CHCl <sub>3</sub>	/	0,07		0,12		1,05		1,06
Phenylacetat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	/	/	/	0,21	0,84	1,26	2,17
	CHCl <sub>3</sub>	/	/	/	/	/	/	/	/
3-Phenyl-propionat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	/	/	/	/	0,42	/	0,97
	CHCl <sub>3</sub>	/	/	/	/	/	0,14	/	0,124
4-Phenyl-butanat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	/	/	/	/	0,81	/	0,96
	CHCl <sub>3</sub>	/	/	/	/	/	0,10	/	0,16
Pimelinat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	/	/	/	/	0	/	0,32
	CHCl <sub>3</sub>	/	/	/	/	/	0	/	0,003
Phenoxyacetat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	/	/	/	0	0,58	0,53	1,60
	CHCl <sub>3</sub>	/	/	/	/	/	0,01	0	0,013

Morphinium-salz	Phase	Gehalt Säure: mg/ml				Gehalt Base: mg/ml			
		8h	24h	32h	48h	8h	24h	32h	48h
Propionat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	/	/	/	/	0,19	/	0,82
	CHCl <sub>3</sub>	/	/	/	/	/	0	/	0
Salicylat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	1,23	2,29	2,52	4,4	0,08	0,96	1,24	1,71
	CHCl <sub>3</sub>	/	/	/	/	/	/	/	/
Sebacat	H <sub>2</sub> O <sup>Akzeptor</sup>	/	0,245	/	0,94	/	0,65	/	0,92
	CHCl <sub>3</sub>	/	0	/	0,87	/	0	/	0,53

Tab.31: Morphin- und Säurekonzentration in der wässrigen Akzeptorphase und der org. Membranphase des U-Rohrs

## **20 . Dampfdruckosmometrische Messungen von Morphinium- und Hydromorphoniumsalzen**

### *20.1 Morphiniumsalze*

Zur Vorbereitung des Dampfdruck-Osmometers wird der Boden des Becherglases in der Meßzelle ca. 1,5 cm hoch mit Lösungsmittel befüllt. Zuvor wird ein als Zubehör erhältlicher Lösungsmitteldocht aus Filterpapier gerollt und in das Becherglas gesteckt. Er dient zur besseren Verteilung des Lösungsmitteldampfes im Becherglas. Als Lösungsmittel wurden Merck LiChrosolv, Isopropanol und Chloroform verwendet. Zur Entfernung des Stabilisators wird das Chloroform über eine 30 cm hohe mit basischem Aluminiumoxid der Aktivität 1 (Woelm Pharma) befüllte Glassäule mit 2,5 cm Durchmesser gereinigt. Während der Messung wird dem Chloroform am Boden des Becherglases ein ca. 1 cm<sup>2</sup> großes Silberfolienstück zur Vermeidung der HCl-Bildung hinzugefügt. Anschließend temperiert sich das Gerät mit Hilfe des Thermostats auf genau 38°C. Nach ca. zwölf Stunden werden zwei mit Lösungsmittel befüllte Spritzen im Zellenkopf 60 Minuten lang ebenfalls auf 38°C temperiert. 60 Minuten später wird mit deren Hilfe auf jeden der Thermistoren ein Tropfen Lösungsmittel aufgebracht. Fünf Minuten darauf läßt sich mit Hilfe der „Zero-Balance“-Regelung der Lösungsmittel-[DIGIT] Wert auf Null einstellen. Durch wiederholtes Auftropfen von Lösungsmittel wird die Richtigkeit dieser Einstellung überprüft und gegebenenfalls nachjustiert. Dabei sind die [DIGIT]-Werte immer in den gleichen Zeitabständen von 30 Sekunden abzulesen und zu notieren. Während dieses Vorganges ist unbedingt auf eine konstante Außentemperatur zu achten. Der Nullwert stellt sich bei Chloroform ca. 2,5 Minuten nach Auftropfen des Lösungsmittels und bei Isopropanol vier Minuten danach ein.

Im Anschluß daran werden bereits vorbereitete Lösungen von Morphin und dreier Säuren gleicher Molalität in Glasspritzen aufgezogen und im Meßzellenkopf 60 Minuten lang auf 38°C temperiert. Nach Beendigung der

Temperatureinstellung wird durch Auftropfen von Morphinlösung gegen Lösungsmittel der Meßbereich erfaßt. Die [DIGIT]-Werte der Morphin-Base und der Säuren werden zunächst in jeweils drei Messungen erfaßt. Der [DIGIT] Wert muß nach dem Zeitraum notiert werden, der zuvor zur Einstellung des Nullwertes für reines Lösungsmittel bestimmt wurde. Anschließend werden gleiche Volumina (je 0,75ml) der Base und der Säure in einem Halbmikroreagenzglas vereinigt und 30 Sekunden per Hand geschüttelt. Die Glasspritzen werden geleert, drei mal mit je 0,3ml der Salzlösung gespült und mit 0,5 ml dieser Lösung befüllt. Nachdem diese Lösung wiederum 60 Minuten lang im Zellenkopf auf 38°C temperiert wurde, wird der Meßvorgang in der gleichen Weise, wie bei den Säure- und Morphin-Base Lösungen, wiederholt. Der Verlauf der Messung wird mit einem linearen Potentiometerschreiber (Goerz Typ 546) aufgezeichnet. Zur Bestimmung der Assoziation des Morphiniumbenzoats in Abhängigkeit von der Konzentration wurden Benzil, Morphin und Benzoessäurelösungen in jeweils vier unterschiedlichen Molalitäten hergestellt. Die Messungen wurden in der beschriebenen Weise durchgeführt.

#### 20.1.1 *Standardvorschrift zur Herstellung von Lösungen genauer Molalität zur Dampfdruckosmolalitätsbestimmung:*

In einen 50 ml Meßkolben wird die für 20 g Lösungsmittel erforderliche Menge Substanz zur Herstellung der gewünschten Molalität genau eingewogen.

(verwendete Waage: Sauter Analysenwaage Typ 404)

Anschließend werden in einem Becherglas 19 g des Lösungsmittels abgewogen und in den Meßkolben gefüllt. Mit einer 225 mm Pasteurpipette wird der Rest des Lösungsmittels vorsichtig hinzugefügt. Die Substanz wird im Ultraschallbad restlos aufgelöst, der Kolben daraufhin fünfmal umgeschüttelt.



### *20.1.2 Bestimmung der Dampfdruckosmolalitätserniedrigung von Morphiniumbenzoatlösungen in Abhängigkeit von der Konzentration*

Die Lösungen werden nach der oben beschriebenen, allgemeinen Vorschrift in jeweils vier unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt.

Der Lösungsmittelwert wird zur Ausnützung des gesamten Rangebereiches von  $-190$  bis  $+190$  (Stufe 2) auf  $-190$  gesetzt. Zu den erhaltenen [DIGIT]-Werten wurde jeweils ein Betrag von  $190$  addiert. Dies entspricht einem Lösungsmittelwert von Null DIGIT. Aus drei Einzelmessungen pro Substanz und Konzentration, wird jeweils der Mittelwert gebildet. Wertetabelle und Diagramme sind im theoretischen Teil abgebildet und diskutiert.

### *20.1.3 Bestimmung der Dampfdruckosmolalitätserniedrigung unterschiedlicher Morphiniumsalze in Chloroform*

Lösungen von jeweils 1-3 Säuren und Morphin-Base werden nach der oben beschriebenen, allgemeinen Vorschrift in einer Konzentration von  $0,005 \text{ mol/kg}$  hergestellt, anschließend wie beschrieben vereinigt und wiederum vermessen. Für weitere Berechnungen wird der aus den drei erhaltenen Meßwerten gebildete Mittelwert (MW) verwendet. Die Ergebnisse der einzelnen Meßreihen sind in den folgenden Tabellen wiedergegeben.

Meßzeitpunkt: 2,5 Minuten

Substanz	MW-DIGIT einzeln	MW DIGIT Salz
Morphin-Base	84,4	/
Benzil	100,2	/
Phenylelessigsäure	73,6	68,7
Phenylpropionsäure	75,7	71,7
Phenylbuttersäure	79,5	80,7

Tab.32

Substanz	MW DIGIT einzeln	MW DIGIT Salz
Morphin-Base	88,8	/
Flurbiprofen	74,6	67,8

Tab.33

Substanz	MW-DIGIT einzeln	MW DIGIT Salz
Morphin-Base	85,7	
Dimethoxyphenylelessigsäure	88,1	79,4
Mefenaminsäure	83,8	75,9
Flufenaminsäure	83	66,6

Tab.34

Substanz	MW-DIGIT einzeln	MW DIGIT Salz
Morphin-Base	86	/
Benzil	106	/
Caprinsäure	82	79
Sebacinsäuremonomethylester	86	83

Tab.35

Substanz	MW-DIGIT einzeln	MW DIGIT Salz
Morphin-Base	88,8	/
Ketorolac	68	54,2
Ketoprofen	83	67,2
Indometacin	76,8	63,4

Tab.36

Substanz	MW-DIGIT einzeln	MW DIGIT Salz
Morphin-Base	91,5	/
Sebacinsäuremonoethylester	75,4	78,7
Suberinsäuremonomethylester	75,4	78,9
Nifluminsäure	80,2	/

Tab.37

Substanz	MW-DIGIT einzeln	MW DIGIT Salz
Morphin-Base	87,60	/
4-Tertbutylbenzoesäure	71,6	74,1
Diphenylelessigsäure	77,2	65,2
Phenoxyessigsäure	78,8	42,6

Tab.38

Substanz	MW-DIGIT einzeln	MW DIGIT Salz
Morphin-Base	85,9	/
Benzil	100,9	/
Salicylsäure	75,9	(ausgefallen)
Naproxen	85,7	73,5

Tab.39

Substanz	MW-DIGIT einzeln	MW DIGIT Salz
Morphin-Base	90	/
Benzil	102,3	/
Trimethylbenzoesäure	85,3	68,2
Ibuprofen	8305	76,8

Tab.40

Substanz	MW-DIGIT einzeln	MW DIGIT Salz
Morphin-Base	83,5	/
Benzil	107	
Benzoessäure	85	69,9

Tab.41

#### 20.1.4 Bestimmung der Dampfdruckosmolaritätserniedrigung unterschiedlicher Morphiniumsalze in Isopropanol

Lösungen von jeweils ein bis drei Säuren und Morphin-Base werden nach der oben beschriebenen, allgemeinen Vorschrift in einer Konzentration von 0,0175mol/kg hergestellt, anschließend wie beschrieben vereinigt und wiederum vermessen. Für weitere Berechnungen wird der aus den drei erhaltenen Meßwerten gebildete Mittelwert (MW) verwendet. Die Ergebnisse der einzelnen Meßreihen sind in den folgenden Tabellen wiedergegeben.

Mezeitpunkt: 3 Minuten

Substanz	MW-DIGIT einzeln	MW-DIGIT Salz
Morphin-Base	96	/
Indometacin	94,7	89
Phenyessigsäure	98,4	93,7
Sebacinsäure	92,3	91,8

Tab.42

Substanz	MW-DIGIT einzeln	MW-DIGIT Salz
Morphin-Base	88,3	/
Sebacinsäuremonomethylester	89,9	86

Tab.43

Substanz	MW-DIGIT einzeln	MW-DIGIT Salz
Morphin-Base	90,5	/
Benzoessäure	89,5	87
Naproxen	91,4	89

Tab.44

Substanz	MW-DIGIT einzeln	MW-DIGIT Salz
Morphin-Base	90,5	/
4-Tertbutylbenzoesäure	93,3	88,8

Tab.45

Substanz	MW-DIGIT einzeln	MW-DIGIT Salz
Morphin-Base	89,6	/
2-Methoxybenzoesäure	89,5	81,52
Trimethylbenzoesäure	88,6	80,8

Tab.46

Substanz	MW-DIGIT einzeln	MW-DIGIT Salz
Morphin-Base	95,4	/
Phenylpropionsäure	96	93,3
Phenylbuttersäure	97	95,6
Mefenaminsäure	95,8	87,8

Tab.47

Substanz	MW-DIGIT einzeln	MW-DIGIT Salz
Morphin-Base	93,4	/
Azealinsäuremonomethylester	92,3	90,4
Laevulinsäure	88,7	90,6

Tab.48

Meßzeitpunkt: vier Minuten

Substanz	MW-DIGIT einzeln	MW-DIGIT Salz
Morphin-Base	103	/
Benzil	108,5	/
Diphenylelessigsäure	102,5	97,5

Tab.49

Substanz	MW-DIGIT einzeln	MW-DIGIT Salz
Morphin-Base	104	/
Benzil	104,9	/
2,5-Dihydroxybenzoesäure	104	84,55
Flufenaminsäure	104,1	95,8

Tab.50

Substanz	MW-DIGIT einzeln	MW-DIGIT Salz
Morphin-Base	100,4	/
4-Brombenzoesäure	105,3	94,3
2,5-Dimethoxyphenylelessigsäure	103,26	98
Flurbiprofen	102,1	100

Tab.51

Substanz	MW-DIGIT einzeln	MW-DIGIT Salz
Morphin-Base	102	/
Benzil	102,2	/
Salicylsäure	105	83

Tab.52

Substanz	MW-DIGIT einzeln	MW-DIGIT Salz
Morphin-Base	102	/
Phenoxyessigsäure	100,6	80
4-Hydroxybenzoesäure	105,5	102,5

Tab.53

Substanz	MW-DIGIT einzeln	MW-DIGIT Salz
Morphin-Base	101	/
Benzil	106	/
Nifluminsäure	100,8	84

Tab.54



## 20.2 Hydromorphoniumsalze

Die Messungen der Hydromorphoniumsalze finden nach den gleichen Vorbereitungen wie bei den Messungen der Morphiniumsalze statt. Alle verwendeten Lösungsmittel und Meßbedingungen sind ebenfalls identisch.

### 20.2.1 Bestimmung der Dampfdruckosmolalitätserniedrigung unterschiedlicher Hydromorphoniumsalze in Isopropanol

Lösungen von jeweils ein bis drei Säuren und Hydromorphon-Base werden nach der oben beschriebenen allgemeinen Vorschrift in einer Konzentration von 0,0175 mol/kg hergestellt, anschließend wie beschrieben vereinigt und wiederum vermessen. Für weitere Berechnungen wird der aus den drei erhaltenen Meßwerten gebildete Mittelwert (MW) verwendet. Die Ergebnisse der einzelnen Meßreihen sind in den folgenden Tabellen wiedergegeben.

Meßzeit: 2,5 Minuten

Substanz	MW-DIGIT einzeln	MW-DIGIT Salz
Hydromorphon-Base	111	/
Sebacinsäuremonomethylester	126	114
Nicotinsäure	120	104
Benzoessäure	109	107

Tab.55

Substanz	MW-DIGIT einzeln	MW-DIGIT Salz
Hydromorphon-Base	118	/
Phenoxyessigsäure	112	98
Caprinsäure	116	115,5
4-Hydroxybenzoessäure	112	114,5

Tab.56

Substanz	MW-DIGIT einzeln	MW-DIGIT Salz
Hydromorphon-Base	118	/
2-Methoxybenzoesäure	111	103
4-Aminobenzoessäure	120	113,5
Hippursäure	117	103

Tab.57

Substanz	MW-DIGIT einzeln	MW-DIGIT Salz
Hydromorphon-Base	114,5	/
Salicylsäure	111,5	87

Tab.58

### 20.2.2 Bestimmung der Dampfdruckosmolaritätserniedrigung unterschiedlicher Hydromorphoniumsalze in Chloroform

Lösungen von jeweils ein bis drei Säuren und Hydromorphon-Base werden nach der oben beschriebenen allgemeinen Vorschrift in einer Konzentration von 0,005mol/kg hergestellt, anschließend wie beschrieben vereinigt und wiederum vermessen. Für weitere Berechnungen wird der aus den drei erhaltenen Meßwerten gebildete Mittelwert (MW) verwendet. Die Ergebnisse der einzelnen Meßreihen sind in den folgenden Tabellen wiedergegeben.

Meßzeit: 4 Minuten

Substanz	MW DIGIT einzeln	MW-DIGIT Salz
Hydromorphon-Base	97,5	/
Caprinsäure	80,2	85
Sebacinsäuremonomethylester	87	85,5
Benzoessäure	69,5	73,5

Tab.59

Substanz	MW DIGIT einzeln	MW-DIGIT Salz
Hydromorphon-Base	91	/
Phenoxyessigsäure	84	46,8
2-Methoxybenzoessäure	108	92
4-Aminobenzoessäure	70	71

Tab.60

**21. Verwendete Substanzen:***21. 1. Freisetzung von Morphin-Base und Hydromorphon-Base aus ihren Hydrochloriden*

10 g des jeweiligen Hydrochlorids werden in 300 ml dest. H<sub>2</sub>O gelöst. Es wird tropfenweise 25% ige NH<sub>3</sub>-Lösung hinzugegeben bis die Base bei pH 10 ausfällt. Der Niederschlag wird abfiltriert und fünfmal mit 20 ml dest H<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wird der Niederschlag bei 100°C 24 Stunden im Vakuum getrocknet. Die Reinheit der Basen wird mit Hilfe einer 1H-NMR-spektroskopischen Untersuchung überprüft. Von den in 10g Morphin-Hydrochlorid Trihydrat enthaltenen 7,58 g Morphin-Base wurden 7,21 g Base erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 95,1%.

Von den in 10g Hydromorphon-Hydrochlorid enthaltenen 8,86g Hydromorphon Base wurden 8,1g Base erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von 91,4%.

*21. 2. Synthese der Heroin-Base aus Morphin-Base.*

2 g Morphin-Base werden in 12ml Acetanhydrid gelöst. Anschließend wird die Lösung 12 Stunden lang bei 81°C unter Rückfluß gerührt. Nach Abkühlen der Lösung werden 5 ml dest H<sub>2</sub>O zugesetzt und die Lösung mit einer konzentrierten Sodalösung auf pH 7 neutralisiert. Der abfiltrierte Niederschlag wird fünfmal mit 15 ml dest. H<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wird der Niederschlag bei 100°C 24 Stunden im Vakuum getrocknet. Die Reinheit der Basen wird mit Hilfe einer Schmelzpunktbestimmung und 1H-NMR-spektroskopischen Untersuchung überprüft.

Ausbeute 1,95 g (75% der theoretischen Ausbeute)

### 21.3 Standardvorschrift zur Herstellung von Morphinium- und Hydromorphoniumsalzen

200 mg Base werden in 15 ml Methanol gelöst. Eine äquimolare Menge der org. Carbonsäure wird in 10 ml Methanol gelöst. Die Lösungen werden vereinigt und im Rotationsverdampfer auf ein Volumen von ca. 5ml eingengt. Die Lösung wird in eine Abdampfschale gegeben. Nach 12-20 h ist das Salz auskristallisiert. Lösungsmittelreste werden in der Vakuumpumpe entfernt.

### 21.4. Verwendete Säuren; (Lieferant)

N-Acetylglycinsäure, Merck(34)	Acetylsalicylsäure, Merck(11)
Acrylsäure, Merck-Schuchardt (20)	2-Methoxybenzoesäure; Merck(9)
Ameisensäure; Merck(16)	4-Tertbutylbenzoesäure; Merck(13)
4-Aminobenzoessäure; Fluka (6)	Morphinhydrochlorid; Merck(1)
4-Amino-2-hydroxybenzoesäure; Fluka(8)	Caprinsäure; Fluka (18)
Anthracen-9-carbonsäure; Merck(26)	Naproxen ICN-Biomedicals(39)
;Flurbiprofen; ICN-Biomedicals(37)	Phenylessigsäure; Merck (22)
Benzoessäure; Merck (5)	Ibuprofen; ICN-Biomedicals(36)
4-Hydroxybenzoesäure; Fluka (7)	Indometacin; ICN-Biomedicals(38)
2,4,6-Trimethylbenzoesäure; Merck(14)	Ketoprofen; ICN-Biomedicals(35)
2-Methyl-3-nitrobenzoesäure; Merck (12)	Ketorolac; ICN-Biomedicals(41)
4-Brombenzoesäure; Fluka(15)	3-Phenylpropionsäure; Merck(23)
D,L- $\alpha$ -Liponsäure; Fluka(19)	4-Phenylbuttersäure; Merck(24)
Flufenaminsäure; ICN-Biomedicals(40)	Pimelinsäure; Merck(33)
Propionsäure; Merck(17)	Nicotinsäure; Merck(21)
Sebacinsäuremonoethylester; Lancaster(30)	Phenoxyessigsäure; Merck(25)
Suberinsäuremonoethylester; Lancaster(31)	Hippursäure; Merck(27)
Sebacinsäure; Fluka(28)	Salicylsäure; Merck-Schuchardt(10)
Sebacinsäuremonomethylester; Lancaster(29)	

Azealinsäuremonomethylester; Lancaster(**32**)

Hydromorphonhydrochlorid; Knoll (**43**)

Für die Herstellung der betäubungsmittelhaltigen Zubereitungen besteht eine Erlaubnis für die Philipps-Universität Marburg bzw. das Institut für pharmazeutische Chemie unter der BtM-Nummer **301 25 93**.

## **23. Durchführung der In-Vivo Untersuchungen zur transdermalen Applikation von Morphin**

### *23.1 Vorschrift zur Applikation eines TTS auf eine Wistar-Ratte und Präparation des Gehirns*

Die Ratte wird mit 400 mg/kg Körpergewicht Chloralhydrat i.p. betäubt. Der betäubten Ratte wird mit einer feinen Schere das Fell auf der Applikationsfläche entfernt und das TTS aufgebracht. Um die Entfernung des TTS durch die Ratte zu verhindern, wird es mit einer selbstklebenden Banderole um den Rattenleib fixiert. Nach 24 Stunden wird die Ratte dekapitiert. Nach Entnahme des Gehirns wird das Kleinhirn, das Striatum und der Cortex vom Restgewebe getrennt. Die Tierversuche wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität Marburg unter der Aufsicht von Herrn Dr. Ferger durchgeführt.

### *23.2 Probenaufarbeitung:*

Eine genau gewogene Menge Hirngewebe wird in 1,5ml Methanol aufgenommen und 30 Sekunden mit dem Ultraturrax bei höchster Stufe zerkleinert. Anschließend wird die Probe zwei Minuten in ein Ultraschallbad gegeben. In einer Hochgeschwindigkeitszentrifuge wird 20 Minuten bei 15596 x g der Geweberückstand abgetrennt. Der Überstand wird mit einer Pipette vorsichtig abgezogen. Im Anschluß daran wird in einer heizbaren Vakuumzentrifuge (Speed Vac) das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wird in 500 µl 0,01N Salzsäure aufgenommen und in Microcon-3 Filter überführt. Zur Filtration wird die Filtereinheit 35 Minuten bei 15596 x g zentrifugiert. Das klare Filtrat wird in ein Autosamplervial überführt.

### *23.3 HPLC-Methode*

-Eluent : Citronensäuremonohydrat 5,25g; Na-EDTA 250 mg; 1N NaOH 30ml  
Octansulfonsäure 50mg; Methanol 68,6 ml; (Lieferant: Fa. Merck); Wasser

901,4 ml.

- Stationäre Phase: Macherey-Nagel ET 125/4 Nucleosil 100-5 C18 HD
- Fluß: 1ml/min; Die Trennung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt
- Injektionsvolumen 100µl
- Detektion: Waters ECD 464 Recorder 1mV-Ausgang Range 10nA
- Oxidationspotential 900 mV; Ag/AgCl-Referenzelektrode Glas-Kohlenstoff Arbeitselektrode.

#### *23.4 Materialien und Geräte*

##### HPLC

- Detektor: Waters EDC 464 / Spannung: 900mV; Range: 10 nA
- Säule: Macherey-Nagel ET 125/4 Nucleosil 100-5 C18 HD
- Integrator: Merck/Hitachi D2500
- Pumpe: Merck-Hitachi L6200

##### Pflaster

- Okklusivfolie: Lohmann Rostaphan RN 15-Folie, Schichtdicke 15µm, PET (Polyethylenterephthalsäure-ethylester)
- Vliesschicht: Lohmann Paratex-Cotton
- Klebeschicht: Lohmann Duplokoll-Polyacrylatkleber

##### Ratten

- Erwachsene, männliche Wistar Ratten (Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, Gewicht ca. 300g Die Tiere wurden unter einem zwölf-Stunden Tag/Nacht (Hell/Dunkel) Rhythmus einzeln in 40 x 20 x 24 cm großen Plexiglaskäfigen gehalten und mit Altromin-Nahrung und Trinkwasser versorgt. Durch die Einzelhaltung wird verhindert, daß die Tiere sich



gegenseitig die Applikationshilfe beschädigen. Die Vorschriften zur Labortierhaltung wurden befolgt<sup>75)</sup>.

## 24. Schmelzpunkte der Morphiniumsalze

Die Schmelzpunkte wurden auf einer Kofler-Heizbank bestimmt

Lfd. Nr.:	Morphiniumsalz	Schmelzpunkt/ Schmelzbereich °C	Bemerkung
1	Acetylsalicylat	82-86	
2	Acrylat	220-250	Ab 220°C. Zersetzung
3	Anthracen-9-carbonat	178-182	Ab 182°C Zersetzung
4	4-Aminobenzoat	228-230	
5	4-Amino-2-hydroxybenzoat	156-164	
6	4-Brombenzoat	134-137	
7	Caprinat	/	Best. nicht möglich, da bereits bei < 44°C pastenartig
8	4-Hydroxybenzoat	162-165	
12	Flurbiprofenat	111-114	
13	Formiat	252-255	
14	Ibuprofenat	84-92	
15	Indometacinat	130-136	
16	Ketoprofenat	118-120	
17	Ketorolacat	148-152	
18	Mefenamat	140-144	
19	2-Methoxybenzoat	220	Schmelzpunkt sehr scharf
20	2-Methyl-3-nitrobenzoat	130-138	Ab 130°C Zersetzung
22	Monomethylazealat	/	Siehe Nr.7
23	Monomethylsuberat	/	Siehe Nr.7
24	4-Phenylbutanat	72-76	
25	3-Phenylpropionat	82-86	
26	Pimelinat	90-96	
28	Propionat	258-260	
29	Salicylat	210-220	
30	4-tert-Butylbenzoat	130-140	
31	2,4,6-Trimethylbenzoat	148-151	

Tab.61: Schmelzpunkte der Morphiniumsalze

## **Lebenslauf**

09.09.1967	Geboren in Ziegenhain.
9/74-7/78	Besuch der Eckhardt Vonholdt Grundschule in Treysa.
9/78-6/87	Besuch des Schwalmgymnasiums in Treysa.
5/87	Abitur
10/87-2/90	Studium der Chemie an der Philipps-Universität Marburg.
2/90	Chemie-Vordiplom
4/90-9/93	Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg.
9/91	Erster Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung.
12/93	Zweiter Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung.
1/94-6/94	Praktikum an der Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie, Arbeitskreis Prof. Dr. Rudolf Matusch.
7/94-12/94	Praktikum in der Stadtapotheke in Wetter.
5/95	Dritter Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung.
6/95	Approbation als Apotheker. Beginn der vorliegenden Dissertation im Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie unter Betreuung von Prof. Dr. Rudolf Matusch.
6/95-2/99	Wissenschaftliche Hilfskraft/wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie. Betreuung des begleitenden Chemiepraktikums zum fünften Fachsemester.
seit 4/99	Inhaber der Stadtapotheke Hilgenberg in Treysa.

**Literatur**

- 1) B.Larsen und F.Macher-Hanselmann; Medikamentöse Behandlung von Tumorschmerzen; *Internist*, **37**; 425-440, (1996)
- 2) C.Dierke-Dzierzon, I.Beau, G.Lindena und M.Sturm; Retardiertes Morphin zur oralen Schmerztherapie; *Fortschritte der Medizin*, **12**, 45-46, (1998))
- 3) H.Goeke, M.Herbst, U.Frucht; Schmerztherapeutische Tumornachsorge; *Klinikerzt*; **1**, (1992)
- 4) H. Wagner; *Pharmazeutische Biologie*; 3. Auflage Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 163, (1985)
- 5) F.W.Sertürner; Darstellung der reinen Mohn-Säure (Opiumsäure) nebst einer chemischen Untersuchung des Opiums mit vorzüglicher Hinsicht auf einen darin neu entdeckten Stoff und die dahin gehörigen Bemerkungen; *J. Pharm. Ärzte Apotheker Chem.*, **14**, 47-93, (1806)
- 6) F.W.Sertürner; Über das Morphinum, eine neue salzfähige Grundlage, und die Meconsäure, als Hauptbestandteile des Opiums; *Ann. Phys.* **25**, 56-90 (1817)
- 7) W.Meissner; Über ein neues Pflanzenalkali (Alkaloid); *J. Chem. Phys.* **25**, 379-381, (1819)
- 8) J. M.Gulland, R. Robinson; Constitution of Codeine and Thebaine; *Mem. Proc. Manchester Lit. Phil. Soc.*, **69**, 79-86 (1925)
- 9) M. Gates, G. Tschudi; *J. Am. Chem. Soc.*; **74**, 1109 (1952); *Ibid*, **78**, 1380, (1956)
- 10) L.Gylbert; *Acta Cryst.*; **29**, 1630 (1973)
- 11) M.Mackay, D.C.Hodgkin; *J. Chem. Soc.*; 3261, (1955)
- 12) E. Bye; The Crystalstructure of Morphine-Hydrat; *Acta Chem. Scand.*; **30**, 549, (1976)
- 13) F.J Muhtadi; Analytical Profile of Morphin-Hydrochlorid; *Florey: Analytical Profiles of Drug-Substances*; Academic Press, 1988; (264-366))
- 14) M. Windholz Edit.; Merck Index, 10<sup>th</sup> ed.; Merck and Co. Inc., Rahway, N.J., (1983)
- 15) B.N.Dhawan, F.Cesselin, R.Raghubir, T.Reisine, P. B. Bradley, P.S. Portoghesi, M.Hamon; *Pharmacological Reviews*, **48**, 567-592, (1996)
- 16) W. Forth, D.Henschler, W.Rummel; *Pharmakologie und Toxikologie*; Wissenschaftsverlag, 6.Auflage, 203-207, (1993)
- 17) E. Mutschler; *Arzneimittelwirkungen*; Wiss.Verlagsgesellsch. Stuttgart., 6,Auflage, 170, (1991)
- 18) B.Frances et al.; *J.Pharmacol. Exp. Ther.*; **262**, 25-31, (1992)
- 19) G.Seitz; Klassiker im Arzneischatz: zentral wirksame Opioid-Analgetika; *Pharmazeutische Zeitung*, **3**, 9-28, (1992)
- 20) S.Ahmedzai, D.Brooks.; *J. Pain SymptomManage*; **13**, 254-261, (1997)
- 21) S. K.Chandrasekaran; Controlled release of scopolamine for prophylaxis of motion sickness.; *Drug Dev. Ind Pharm.*, **9**, 627-646 (1983)

- 22) T.Y.Chien, S.J. Wu, S.J.Gong, Y.W. Chien.; Transdermal contraceptive delivery system: preclinical development and clinical assessment *Drug; Dev. Ind. Pharm.*, **20**, 633-664, (1994)
- 23) K.Walter, M.Müller, M. F.Barkworth, A.V.Niecieki, F.Stanislaus; Pharmakokinetiks of physostigmin in man following single administration of a transdermal system.; *Br.J.Clin. Pharmakol.*; **39**, 59-63, (1995)
- 24) S.D. Roy, E.Manoukian, D.Combs.; Absorbtion of Transdermally Delivered Ketorolac Acid in Humans.; *J.Pharm. Sci.*; **84**, 49-52, (1995)
- 25) A.K.Sha, G.Wie, R.C. Lamman, V.O. Bhargava and S.J. Weir; Percutaneous absorption of Ketoprofen from different anatomical sites in Man; *Pharm Res.*, **13**, 168-172, (1996)
- 26) P.C. Wu, Y. B. Huang, J. Y. Fang and Y. H. Tsai.; In vitro percutaneous absorption of captopril; *Int. J. Pharm.*, **148**, 41-46 ,(1997)
- 27) S.Tenjarla, P. Puranajoti, R. Kasina and T. Mandal; Terbutaline Transdermal Delivery: Preformulation Studies and Limitations of In Vitro Predictive Parameters; *J. Pharm. Phamacol.*, **48**, 1138-1142, (1996)
- 28) H. Franke and M.Horstmann; Transdermal Feasibility of Aspirin Containing Adhesive Systems: A Correlation between In Vitro Rat Skin Flux and In Vivo Efficacy; *Proc. Int. Symp. Contol. Rel. Bioactive Mater*, **22**, 658-659, (1995)
- 29) B. J. August, J. A. Blake, N.J. Rogers, and M. A. Hussain; Transdermal Oxymorphon Formulation Developement and Methods for Evaluating Flux and Lag Times for Two Skin Permeation-Enhancing Vehicles; *J. Pharm. Sci.*, **79**, 1072-1076, (1990)
- 30) Karl Sommer; *Der Mensch*; VeV Berlin, 380, (1989)
- 31) Russel O. Potts; Physical Charakterisation of the Stratum Corneum: The Relationship of Mechanical and Barrier Properties to Lipid and Protein Structure; *J. Hadgraft, R.Guy (Eds.) Transdermal Drug Delivery*, Marcel Dekker Inc. New York and Basel, 23-58, (1989)
- 32) K.A. Holbrook, G.F. Odland; Regional Differences in the Thicknes (cell layers) of the Human Stratum Corneum: An Ultrastruktrual Analysis; *J. invest.Dermatol.*, **62**, 415-422, (1974)
- 33) P.W.Wertz, D.T. Downing; Stratum Corneum: Biological and Biochemical Considerations; *Transdermal Drug Delivery : Developmental Issue and Research Initiatives*, J.Hadgraft,H.R. Guy (eds) ,Marcel Dekker Inc. New York, 1-22, (1989)
- 34) R. Neubert, U.Schmalfuß, Wohlrab, C.Huschka; Wirkstoffpenetration durch die Haut und deren Modulation; *Pharmazeutische Zeitung*; **17**; 11-23, (1996)
- 35) J.Guy, R.H.Hadgraft; Transdermal Drug Delivery The ground rules are emerging; *J.Pharm.Int*, **6**, 112-116, (1985)
- 36) J.Guy, R.H.Hadgraft; Selection of Drug Candidates for Transdermal Drug Delivery; *Transdermal Drug Delivery*, M. Dekker Inc., 60-81, (1989)
- 37) A. Zaffaroni, German Patent 21355339.41, (1971)

- 38) R.W.Baker; Controlled release of biologically active agents; John Wiley, New York, 161-162, (1987)
- 39) G.B. Kasting, R.L. Smith and E.R.Cooper; Effect of Lipid Solubility and Molecular Size on Percutaneous Absorption; *Skin Pharmacokinetics*, S.Karger, Basel, 738-743, (1987)
- 40) H.Schaefer, A. Zesch, and G. Stüttgen; *Skin Permeability*; Springer Verlag, Berlin (1982)
- 41) D.E. Wurster, R.E. Dempsey; Adsorption of Lipid-Soluble Substances by Human Keratin; *J. Am. Pharm. Assoc.*, 49, 305-307, (1960)
- 42) R.H. Guy, J. Hadgraft, D.A.W. Bucks; Transdermal Drug Delivery and Cutaneous Metabolism; *Xenobiotica*, 17, 325-343, (1987)
- 43) M.Katz, B. J. Poulsen; Absorption of Drugs through the Skin; *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol.28, Springer-Verlag, New-York, 103-174 (1971)
- 44) T. Yano, A. Nakagawa, M. Tsuji, and K. Noda; Skin Permeation of Various Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Man; *Life Sci.*, 39, 1043-1050, (1986)
- 45) R.R. Burnette, D. Marrero; Comparison between the Iontophoretic and Passive Transport of Thyrotropin Releasing Hormone Across Excised Nude Mouse Skin; *J.Pharm. Sci.*, 75, 738-743, (1986)
- 46) K.A. Walthers; Penetration Enhancers and Their Use in Transdermal Therapeutic Systems; *J.Hadgraft, R.H.Guy Transdermal Drug Delivery*, Marcel Dekker Inc. 197-245 (1989)
- 47) R.Matusch, H.R.Hoffman, T.Hille, A.Koch; Deuterierte Wirkstoffe in transdermalen Applikationen; Patent DE 43 43 838 A1, (1995)
- 48) Koch A ;geplante Diss; unveröffentlichte Daten
- 49) T. Higuchi; In Design of Biopharmaceutic properties through Prodrugs and Analogs; B.Roche (ed.). *American Pharmaceutical Association*, Washington D.C. 409-421 (1977)
- 50) N.Barker, J. Hadgraft; Facilitated Percutaneous Absorption, A model system; *Int.J.Pharm.*, 8, 193-202, (1981)
- 51) S. Kazmi, L. Kennon, M. Sideman, and F.M. Plakogiannis; Medicament Release from Ointment Bases Indometacin In Vitro and In Vivo Release Studies; *Drug Develop.Ind.Pharm.*, 10, 1071-1083 (1984)
- 52) P.R.Keshory, Y.C.Huang, Y.W.Chien; *Drug Develop. Ind. Pharm.*, 11, 1213-1254, (1985)
- 53) U. Täuber; Drug Metabolism in the skin: Advantages and Disadvantages; *J.Hadgraft, R.H. Guy: Transdermal Drug Delivery*, Marcel Dekker, INC., 99-112, (1989)
- 54) M. Kirch, J.M. Lehn; Selektiver Transport von Alkalimetall-Kationen mit makrobicyclischen Carriern durch flüssige Membranen; *Angew. Chemie*, 87, 542-543, (1975)

- 55) W.M. Meylan, P.H. Howard; Atom/Fragment Contribution Method for Estimating Octanol-Water Partition Coefficients; *J.Pharm. Sci.*, **84**, 83-92, (1995)
- 56) F.W Mc. Lafferty, F. Turecek; *Interpretation von Massenspektren*; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford, (1995)
- 57) M. Linscheid; Instrumental Developments in Organic Mass Spectrometrie; *Fresenius J. Anal. Chem.*, **337**, 648-661,(1990)  
E.C. Horning, M.G. Horning D.I Carrol, I. Dzidic R.N. Stillwell; *Anal. Chem.*, **45**, 936, (1973)
- 58) M.Przybylski, M.P. Glockner; Elektrospray-Massenspektrometrie von Biomakromolekülen mit nichtkovalenten Wechselwirkungen; neue analytische Perspektiven für supramolekulare Chemie und molekulare Erkennungsprozesse; *Angew. Chem.*, **108**, 878-899, (1996)
- 59) J.Sunner, G.Nicol, P.Kebarle; *P. Anal.Chem.*, **60**, 1300-1307,( 1988)
- 60) A.Zschunke; *Molekülstruktur: Form, Dynamik, Funktion*; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, (1993)
- 61) E.Martinborough, T.M.Denti, P.P.Castro, T.B.Wyman; C.B.Knobler, F.Diederich; Chiral 1,1'-Binaphtyl Molecular Clefs for the Complexation of Exicatory Amino-Acid Derivates; *Helvetica Chimica Acta*, **78**, 1037-1066; (1995)
- 62) P.Strazewski; Calculating the Thermodynamics of Weakly Hydrogen-Bonded Complexes from Heteronuclear NMR Data: Base-Pairing Stabilities of a 5-Methyl(<sup>15</sup>N<sub>2</sub>)[O<sup>2</sup>,O<sup>4-17</sup>O<sub>2</sub>]uridine (= (<sup>15</sup>N<sub>2</sub>[O<sup>2</sup>,O<sup>4-17</sup>O<sub>2</sub>] Ribosylthymine) Derivate, and Structurel Implications; *Helvetica Chimica Acta*; **78**; 1112-1143, (1995)
- 63) P.J.Borg, B.R.Sitaram, D.A.Taylor; Ion-Pair Extraction and Liquid Chromatographic Analysis of Morphine in Rat Brain and Plasma; *Journal Of Chromatography*, **621**, 165-172, (1993)
- 64) H.G.Müller; Dissertation; Marburg 1985
- 65) Auterhoff, Knabe, Höltje; *Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie*; 12.Auflage, wiss.Verlag Stuttgart, 426, (1991)
- 66) Merck-Index 11<sup>th</sup> ed; Merck and Co. Inc., Rahway, N.J., 1102 (1998)
- 67) B.J. Aungst, J.A.Blake, N.J.Rogers, M.A.Hussain; Transdermal Oxymorphon Formulation Developement and Methods for Evaluating Flux and Lag Times for Two Skin Permeation-Enhancing Vehicles; *J.pharm.Scienc.*, **79**, 1072-1077, (1990)
- 68) O.Hesse; *Liebigs Ann. Chem.*, **222**, 205, (1884)
- 69) Ullmann; *Handbuch*; 3. Auflage, Band 3, 241
- 70) I.Weber; Verschreibung v.Heroin für Drogenabhängige; Deutsche Apotheker Zeitung, **28**, 57-62, (1997)
- 71) Rohdes, Grossmann; Hydromorphon Polymerimplant; *J. Sub. Abuse treatm.*, **14**, 535-542, (1997)

- 72) Colin D. Granger; Transdermal Buprenorphine for Treatment of Cocaine, Heroin Addiction-Using Acrylic Adhesive Patch; Patent-Nr.: EP 432945, (1990)
- 73) I.Chiang, G.Flynn, E.Roos, K.Sharma; New Ion-Pair Complex of Buprenorphine and Organic-Providing High Flux in Transdermal Delivery Systems, for Treating Pain and Heroin Addiction; Patent-Nr.: WO 9314727, (1993)
- 74) R.Hoffmann, B.Assmussen, A.Koch; T.Hille, R.Matusch, B.Adam; Acid addition salts of Morphinalkaloids and the application thereof; Pat.-Nr.: WO 99/15528, (1999)
- 75) NIH-Publikations Nr.:85-23, (1985)